



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
AMBIENTAL**

SAMANTHA NAOMI MONFREDINI ALENCAR

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROALGAL SOB
DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO UTILIZANDO
A VINHAÇA COMO MATÉRIA-PRIMA: ANÁLISE DE
CRESCIMENTO E POTENCIAL BIORREMEDIADOR A
PARTIR DA RECUPERAÇÃO DE NUTRIENTES**

**LAVRAS - MG
2021**

SAMANTHA NAOMI MONFREDINI ALENCAR

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROALGAL SOB DIFERENTES
CONDIÇÕES DE CULTIVO UTILIZANDO A VINHAÇA COMO MATÉRIA-
PRIMA: ANÁLISE DE CRESCIMENTO E POTENCIAL BIORREMEDIADOR A
PARTIR DA RECUPERAÇÃO DE NUTRIENTES**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Ambiental, área de
concentração em Mudanças
climáticas, energia e poluição
atmosférica, para a obtenção do título
de Mestre.

Prof. Dr. Adriano Viana Ensinas
Orientador

Profa. Dra. Luciene Alves Batista Siniscalchi
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Alencar, Samantha Naomi Monfredini.

Avaliação do crescimento microalgal sob diferentes condições de cultivo utilizando a vinhaça como matéria-prima : Análise de crescimento e potencial biorremediador a partir da recuperação de nutrientes / Samantha Naomi Monfredini Alencar. - 2021.

101 p.

Orientador(a): Adriano Viana Ensinas.

Coorientador(a): Luciene Alves Batista Siniscalchi.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Biomassa microalgal. 2. Tratamento de efluente agroindustrial. 3. Recuperação de nutrientes. I. Ensinas, Adriano Viana. II. Siniscalchi, Luciene Alves Batista. III. Título.

SAMANTHA NAOMI MONFREDINI ALENCAR

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROALGAL SOB DIFERENTES
CONDIÇÕES DE CULTIVO UTILIZANDO A VINHAÇA COMO MATÉRIA-
PRIMA: ANÁLISE DE CRESCIMENTO E POTENCIAL BIORREMEDIADOR A
PARTIR DA RECUPERAÇÃO DE NUTRIENTES.**

**VINASSE AS A GROWTH MEDIUM FOR MICROALGAE CULTIVATION:
NUTRIENTS INFLUENCE AND BIOREMEDIATION POTENTIAL.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Ambiental, área de
concentração em Mudanças
climáticas, energia e poluição
atmosférica, para a obtenção do título
de Mestre.

APROVADA em 30 de novembro de 2021.

Dr. Ronaldo Fia UFLA

Dr. Eduardo de Aguiar do Couto UNIFEI



Prof. Dr. Adriano Viana Ensinas
Orientador

Profa. Dra. Luciene Alves Batista Siniscalchi
Coorientadora

LAVRAS – MG

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar sabedoria e força para alcançar esta conquista.

Ao Rafael, por me incentivar e me apoiar sempre, sendo um grande companheiro da minha vida.

Aos meus pais e toda a família, que mesmo distante, sempre me apoiaram nesta jornada.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade concedida.

Aos professores Adriano Ensinas, Luciene Siniscalchi e Paula Assemany, por serem exemplos de motivação e paixão pela pesquisa, por toda a orientação e ensinamentos.

Aos professores Ronaldo Fia, Eduardo Couto, Mateus Matos e Whasley Ferreira, por aceitarem o convite para participação da banca e pelas valiosas contribuições.

À técnica de Laboratório do Departamento de Recursos Hídricos e Saneamento, Setor de Saneamento Ambiental, Juliana Giacoppo, por todos os ensinamentos laboratoriais.

A todos os colegas e companheiros de Laboratório do Departamento de Recursos Hídricos e Saneamento, Setor de Saneamento Ambiental, pela convivência e ajuda do dia-a-dia, que foram momentos tanto de descontração, quanto de aprendizagem.

RESUMO GERAL

Com o aumento da preocupação em relação aos problemas ambientais, principalmente em relação a emissão de gás carbono, uma das alternativas para minimização dos impactos ambientais negativos pode ser a substituição dos combustíveis fósseis por biocombustíveis. Com isso, o setor sucroalcooleiro vem se destacando devido a possibilidade de produção do etanol a partir da cana-de-açúcar, e o Brasil vem se destacando por ser um dos principais produtores de etanol no mundo. Entretanto, no processo de transformação da cana-de-açúcar em etanol são gerados cerca de 13 L de vinhaça a cada 1 L de álcool produzido. A característica da vinhaça pode variar de acordo com a espécie da cana-de-açúcar e pelo processo de maturação, mas no geral apresenta alta concentração de nutrientes como nitrogênio e potássio, razão pela qual são frequentemente utilizadas para fertirrigação das lavouras de cana-de-açúcar. No entanto, a aplicação frequente no solo ou o descarte incorreto desse resíduo pode ser prejudicial ao meio ambiente, pois características como alta concentração de matéria orgânica, baixo pH, elevada corrosividade, além da presença de nutrientes como nitrogênio, fósforo, potássio e compostos fenólicos podem causar contaminações ambientais. Por isso, diversos estudos buscam soluções para tratamento da vinhaça, e uma das alternativas promissoras pode ser o cultivo de microalgas, as quais apresentam além da capacidade de biorremediação, a possibilidade do uso da biomassa microalgal para produção de biocombustível. Assim, este estudo avaliou o cultivo de microalgas sob diferentes condições de crescimento utilizando-se a vinhaça como matéria prima, com intuito de identificar as melhores condições de cultura. Para tal, realizou-se os cultivos e diluições tanto em água destilada como em meio BG11. Dessa forma, objetivou-se verificar a influência da vinhaça no crescimento das microalgas em meio com enriquecimento de nutrientes (BG11) e outro meio sem enriquecimento (água destilada), além de determinar o potencial de biorremediação da vinhaça a partir do cultivo de microalgas. Considerando que as microalgas atuam como um biorremediador, a sua aplicação pode ser viável como um processo terciário de tratamento de efluentes, quando utilizados principalmente com diluição e correção do pH, fatores que podem auxiliar na melhoria da produtividade. Os resultados mostram que o cultivo com 100% vinhaça e 50% vinhaça (BG11 e água destilada) não apresentaram taxa de crescimento celular. O cultivo com 10% vinhaça em BG11 apresentou melhor crescimento (μ máx = 0,48 d⁻¹) comparado ao cultivo com água destilada (μ máx = 0,23 d⁻¹). Os cultivos com 10% vinhaça (BG11 e água destilada) e controle apresentaram 100% de eficiência de remoção de N-NH₄⁺ e P, os quais demonstram a possibilidade de utilização de microalgas para biorremediação de vinhaça. No entanto, especificamente para o nitrogênio, verificou-se que o principal mecanismo de remoção foi a volatilização, não havendo recuperação considerável do nutriente na forma de biomassa.

Palavras-chave: Biomassa microalgal. Tratamento de efluente agroindustrial. Recuperação de nutrientes.

ABSTRACT

With the growing concern about environmental problems, especially in relation to carbon gas emissions, one of the alternatives to minimize negative environmental impacts may be the replacement of fossil fuels by biofuels. As a result, the sugar and alcohol sector has been standing out due to the possibility of producing ethanol from sugarcane, and Brazil has been standing out for being one of the main ethanol producers in the world. However, in any process of transforming sugarcane into ethanol, approximately 13 L of vinasse is generated for every 1 L of alcohol produced. The characteristics of the vinasse can vary according to the species of sugarcane and the maturation process, but in general it has a high concentration of nutrients such as nitrogen and potassium, which is why they are often used for fertigation in sugarcane crops -of sugar. However, frequent application to the soil or incorrect disposal of this residue can be harmful to the environment, as characteristics such as high concentration of organic matter, low pH, high corrosivity, in addition to the presence of nutrients such as nitrogen, phosphorus, potassium and phenolic compounds can cause environmental contamination. Therefore, several studies seek solutions for treating vinasse, and one of the promising alternatives may be the cultivation of microalgae, as they present, in addition to their bioremediation capacity, a possibility of using microalgal biomass for biofuel production. Thus, this study evaluated the cultivation of microalgae under different growth conditions using vinasse as a raw material, in order to identify the best culture conditions. For this purpose, cultures and dilutions were carried out both in distilled water and in BG11 medium. Thus, the objective was to verify the influence of vinasse on the growth of microalgae in a medium with nutrient enrichment (BG11) and another medium without enrichment (distilled water), in addition to determining the potential for bioremediation of vinasse from the cultivation of microalgae. Considering that microalgae act as a bioremediator, its application can be viable as a tertiary effluent treatment process, when used mainly with dilution and pH correction, factors that can help to improve productivity. The results show that cultivation with 100% vinasse and 50% vinasse (BG11 and distilled water) does not feed cell growth rate. Cultivation with 10% vinasse in BG11 showed better growth ($\mu_{max} = 0.48 \text{ d}^{-1}$) compared to cultivation with distilled water ($\mu_{max} = 0.23 \text{ d}^{-1}$). Cultivations with 10% vinasse (BG11 and distilled water) and control showed 100% efficiency in removal of N-NH_4^+ and P, which demonstrates the possibility of using microalgae for bioremediation of vinasse. However, specifically for nitrogen, it was found that the main removal mechanism was volatilization, with no considerable recovery of the nutrient in the form of biomass.

Keywords: Microalgal biomass. Agroindustrial effluent treatment. Nutrient recovery.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	11
1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1. Vinhaça	13
2.2. Microalgas	16
2.2.1. Composição microalgal	18
2.2.2. Curva de crescimento microalgal	23
2.2.3. Produção de biomassa algal	26
2.3. Fatores que influenciam o cultivo de microalgas	28
2.3.1. Nutrientes	28
2.3.2. Iluminação	37
2.3.3. Temperatura	39
2.4. Reatores de cultivo das microalgas	41
2.5. Cultivo de microalgas em efluentes domésticos e agroindustriais	43
2.6. Cultivo de microalgas em vinhaça	46
3. CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	71
1. INTRODUCTION	72
2. MATERIAL AND METHODS	74
2.1. Development of the inoculum	74
2.2. Initial culture in Erlenmeyers in the laboratory	74
2.3. Sampling of vinasse used as a culture medium	75
2.4. Microalgae cultivation	76
2.5. Monitoring of microalgae growth	77
2.6. Monitoring of vinasse bioremediation	77
2.7. Statistical analysis	78
3. Results and Discussion	79
3.1. Initial characterization of the culture medium	79
3.2. Variation of pH values under different growth conditions	79
3.3. Microalgal growth assessment	81
3.3.1. Microalgae cell count	81
3.3.2. Chlorophyll <i>a</i>	83

3.3.3. Microalgae growth rate	85
3.3.4. Chl <i>a</i> / VSS ratio	87
3.4. Biomass production	88
3.5. Nutrients recovery potential	90
4. CONCLUSIONS	96
ACKNOWLEDGMENTS.....	96
REFERENCES	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físicas e químicas da vinhaça.....	14
Tabela 2 - Composição biomolecular das microalgas e cianobactérias.	19
Tabela 3 - Valores de taxa de crescimento específico (μ) encontrados ao cultivar em vinhaça, com diferentes diluições.....	25
Tabela 4 - Macronutrientes importantes para o cultivo das microalgas.	29
Tabela 5 - Teor de nitrogênio, fósforo e potássio encontrado em efluente proveniente da suinocultura, laranja e aterro sanitário.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular das clorofilas a (1) e b (2).	22
Figura 2 - Curva de crescimento microalgal.	23
Figura 3 - Sistema de cultivo aberto, tipo raceway.	41
Figura 4 - Fotobiorreator tipo flat plate.	42
Figura 5 - Fotobiorreator do tipo Tubular.	43
Figura 6 - Fotobiorreator do tipo bubble column.	43

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

O uso desenfreado dos recursos naturais vem causando uma série de impactos ambientais negativos, como o aquecimento global. Uma das alternativas promissoras para minimização desses impactos ambientais negativos pode ser a substituição dos combustíveis fósseis por biocombustíveis.

Os biocombustíveis são provenientes de biomassas renováveis e podem ser produzidos a partir de inúmeras matérias-primas de origem agrícola, como por exemplo, cana-de-açúcar, milho, girassol, soja, palma, etc. (GAIVÃO, 2013). Dentre estas, a cana-de-açúcar é a matéria-prima mais produzida no mundo, tendo como seus principais produtos o açúcar e etanol (GOES; MARRA; SOUZA, 2008). Em 2017, 85% do etanol produzido no mundo vieram do Brasil e Estados Unidos, sendo uma importante alternativa para substituição dos combustíveis fósseis (SYDNEY et al., 2021; BORDONAL et al., 2018).

No processo de transformação da cana-de-açúcar em etanol é gerado um resíduo denominado vinhaça (DE MELO et al., 2018), o qual muitas vezes é utilizado na fertirrigação das lavouras por ser um subproduto rico em nutrientes (SILVA; ABUD, 2016). Suas características podem depender do grau de maturação, fermentação e também da espécie da cana-de-açúcar. No entanto, no geral apresenta altas concentrações de matéria orgânica, pH ácido, nutrientes como nitrogênio, fósforo, potássio e compostos fenólicos, que intensificam a coloração escura (PARSAEE; KIANI; KARIMI, 2019; SANTOS et al., 2019; HOARAU et al., 2018). Com isso, diversas pesquisas buscam outras soluções de tratamento e outros usos para esse resíduo (SINGH; PATEL, 2012), sendo que, dentre elas, destacam-se as que avaliam a vinhaça como uma alternativa para cultivo de microalgas (ORTEGÓN et al., 2016; PARNAUDEAU et al., 2008).

As microalgas podem ser consideradas como uma fonte de energia renovável promissora, pois são capazes de gerar produtos importantes em diversos âmbitos tecnológicos, como por exemplo, matéria prima para produção de biocombustível (ZORN et al., 2016). As microalgas apresentam teor de lipídio, o qual pode ser influenciado pelas variações de alguns fatores durante o cultivo, como nutrientes, temperatura e luminosidade (CHEW et al., 2017). Possuem como vantagem a alta produtividade, sendo que algumas espécies podem apresentar até o dobro de produção

de biomassa comparado à cana-de-açúcar (CHIES, 2020). Além disso, são capazes de sobreviverem em ambientes considerados contaminados, utilizando os macronutrientes como nitrogênio, fósforo, enxofre e ferro, e os micronutrientes como cobre, manganês e zinco presentes na água para o seu desenvolvimento (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014).

Sendo assim é possível cultivar as microalgas em diversos meios, como em águas residuárias provenientes de Estação de Tratamento de Esgoto – ETE (esgoto doméstico), efluentes de granja de suinocultura ou bovinocultura, industriais ou até mesmo em vinhaça, obtendo como resultado o tratamento do efluente utilizado como meio de cultivo e a biomassa de microalgas para produção de biocombustíveis. Diversos estudos avaliaram o tratamento da vinhaça utilizando microalgas (DE MELO, 2018; SYDNEY et al., 2019; SANTANA et al., 2017), entretanto, o potencial de produção das microalgas a partir da vinhaça como meio de cultivo ainda é pouco conhecido, necessitando de mais estudos que avaliem condições adequadas para crescimento e proliferação desses microrganismos (SYDNEY et al., 2019).

Nesse sentido, este trabalho avaliou o cultivo de microalgas sob diferentes condições de crescimento utilizando-se a vinhaça como matéria-prima (vinhaça não diluída e diluída a 10% e 50%), com intuito de identificar as melhores condições de cultivo. Para tal, realizou-se cultivos tanto em água destilada como em meio com enriquecimento de nutrientes (BG11) com o intuito de verificar a influência da vinhaça no crescimento das microalgas em meio BG11 e outro meio sem enriquecimento (água destilada), além de compreender sobre a possibilidade de recuperação de nutrientes presentes na vinhaça a partir do cultivo de microalgas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Vinhaça

Com o aumento da preocupação em relação aos problemas ambientais, o setor sucroalcooleiro vem se destacando, visto que o etanol produzido a partir da cana-de-açúcar é um eficiente biocombustível renovável (CONAB, 2020). A produção mundial de cana-de-açúcar é cerca de 1,5 bilhão de t.ano⁻¹, representando uma das matérias-primas mais produzidas no mundo (SYDNEY et al., 2021). Tendo o Brasil como seu maior produtor, apresenta um papel importante para a economia do país, movimentando mais de R\$72 milhões em 2017 (CONAB, 2020). No entanto, no processo de transformação da cana-de-açúcar em etanol é gerado um resíduo denominado vinhaça, na proporção de 13 L para cada 1L de álcool produzidos (DE MELO et al., 2018).

A grande parte da produção de etanol no Brasil ocorre em usinas sucroalcooleiras, que utilizam um processo de fabricação de açúcar e etanol de forma integrada na planta industrial (NOGUEIRA; CAPAZ, 2015). Tal processo inicia-se pela lavagem e preparo da cana-de-açúcar para a moagem, onde é extraído o caldo, o qual pode ser destinado para a fabricação de etanol ou de açúcar. Na produção de etanol, o caldo passa por filtração e fermentação por leveduras, gerando o vinho, que é encaminhado para as colunas de destilação, onde é produzido o etanol hidratado. Nessa etapa é gerado o efluente denominado vinhaça (POVEDA, 2019; ÚNICA, 2019), cuja características físicas e químicas podem variar de acordo com a espécie da cana, dos sistemas de destilação, fermentação, da composição do caldo e também da qualidade do vinho (DE GODOI et al., 2019).

Muitas das vezes a vinhaça é utilizada na fertirrigação das lavouras de cana-de-açúcar por ser um subproduto rico em nutrientes (SILVA; ABUD, 2016), no entanto, é um efluente extremamente ácido e apresenta alta carga orgânica, podendo ser prejudicial ao meio ambiente quando descartado de forma incorreta (SILVA; ABUD, 2016; CAVALETT et al., 2011; CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

Na Tabela 1 são apresentadas as características físicas e químicas da vinhaça relatadas por diversos autores. Apesar das elevadas concentrações de DQO, DBO e de sólidos serem considerados como características negativas para o cultivo de microalgas, a elevada relação C/N pode ser considerada como um ponto positivo, comparado ao efluente doméstico por exemplo, pois a alta concentração de nutrientes como o carbono

no meio é um dos elementos essenciais para obtenção de maior desenvolvimento microalgal.

Tabela 1 - Características físicas e químicas da vinhaça.

Variável	Valor	Referência
Demanda química de oxigênio total (mgDQO L ⁻¹)	27.500 – 299.250	
Demanda bioquímica de oxigênio (mgDBO L ⁻¹)	5,046 – 47.636	
Sólidos suspensos voláteis (mgSSV L ⁻¹)	1.620 – 15.860	
Fenóis (mg L ⁻¹)	450 – 469	Parsaee; Kiani;
Fósforo total (mgP L ⁻¹)	1 – 190	Karimi, 2019
Nitrogênio Kjeldahl total (mgNTK L ⁻¹)	40 – 4.004	
Potencial de hidrogênio (pH)	3,25 – 4,97	
Ferro (mgFe L ⁻¹)	2.792	
Magnésio (mgMg L ⁻¹)	16 – 1.529	
Potássio (mgK L ⁻¹)	40 – 7.830	
Demanda química de oxigênio solúvel (mgDQO L ⁻¹)	14.517 – 55,167	Santos et al., 2019
Razão Carbono-nitrogênio (C/N)	~20	Johnson et al., 2019
Sólidos Totais (mgTS L ⁻¹)	14.570 – 81.500	
Sólidos voláteis totais (mgTVS L ⁻¹)	9.340 – 22.000	
Sólidos suspensos totais (mgSST L ⁻¹)	1.880 – 46.390	Parsaee; Kiani; Karimi, 2019;
Nitrogênio amoniacal (mgN-NH ₄ ⁺ L ⁻¹)	24,18 – 45,00	Del Nery et al., 2018
Nitrato (mgN-NO ₃ ⁻ L ⁻¹)	441,00 – 648,36	
Alcalinidade total (mgCaCO ₃ L ⁻¹)	0 – 295	

Ácidos graxos voláteis (mgHAc L ⁻¹)	433 – 5.882	Parsaee; Kiani; Karimi, 2019; Siqueira; Damiano; Silva, 2013
--	-------------	--

Fonte: Do autor (2021).

Essas características fazem com que a vinhaça *in natura* seja um efluente que oferece diversos riscos de contaminação ambiental. A aplicação da vinhaça em lavouras é uma prática muito comum pois reduz o uso de agroquímicos e também o descarte em corpos d'águas. No entanto, pode ocasionar a salinização do solo, reduzindo a produtividade da lavoura (CHRISTOFOLETTI et al., 2013), além dos problemas estruturais e de permeabilidades que pode ocorrer devido a lixiviação de potássio e nitrato, contaminando até mesmo o lençol freático (DA SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007; OLIVEIRA et al., 2015). Já o descarte de vinhaça *in natura* em corpos d'águas pode ocasionar a eutrofização devido à alta concentração de nutrientes presente na vinhaça, promovendo o esgotamento do oxigênio dissolvido (BATTISTI et al., 2019).

Com isso, o seu tratamento torna-se primordial antes do descarte, e diversos estudos são desenvolvidos em busca do melhor tratamento para redução das contaminações ambientais (SILVA; ABUD, 2016). Dentre os diversos métodos, pode-se citar o tratamento físico-químico (ARAUJO; OLIVEIRA, 2016; CANDIDO; LOMBARDI; LIMA, 2015), adsorção em carvão de bagaço de cana-de-açúcar (SEIXAS; GIMENES; FERNANDES-MACHADO, 2016.) e reator anaeróbio (TELH, 2017). No entanto, a digestão anaeróbia e o cultivo de microalgas vem sendo apontados como alternativas promissoras (MORAES et al., 2014; FORTI et al., 2020). A digestão anaeróbia da vinhaça, que consiste na degradação da matéria orgânica por microrganismos na ausência de oxigênio, gera como um dos subprodutos o biogás, composto principalmente por CH₄ e CO₂, onde este processo auxilia na mitigação dos impactos ambientais negativos (SANTOS et al., 2019).

Já o cultivo de microalgas é uma alternativa sustentável de tratamento do efluente. A partir dos nutrientes presentes na vinhaça a biomassa microalgal é cultivada, o que possibilita na redução do potencial de poluição da vinhaça e promove a produção

de biocombustíveis. No entanto, o cultivo de microalgas ainda é um desafio, pois apesar de apresentar valores de nutrientes importantes para o desenvolvimento microalgal, a alta turbidez, baixo pH, além da presença de microrganismos heterotróficos pode dificultar o seu crescimento, necessitando de diluições ou pré-tratamentos para tornar a vinhaça um meio com melhores características para o cultivo de microalgas (CANDIDO, 2015).

2.2. Microalgas

As microalgas são algas microscópicas, unicelulares e eucariontes (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014), diferenciadas pela presença de cromossomos, organelas envoltas por membranas, e por apresentarem grande diversidade filogenética (TORTORA; FUNKE, 2000; BARSANTI et al., 2008).

As microalgas apresentam imensa diversidade genética, fisiológica e morfológica e são encontradas principalmente em ambientes aquáticos dulcícolas ou salinos (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014), mas também encontram-se disponíveis em solos. Cada espécie apresenta uma capacidade única de se desenvolver em ambiente específico, como em meios com diferentes pH, concentração de gás carbônico, amônia ou em ambiente salino (NAGARAJAN et al., 2020).

São classificadas quanto à pigmentação, constituintes da parede celular e seus produtos de reserva (TOMASELLI, 2004), além das estruturas ou ocorrências de flagelos, caracterização de envoltório do cloroplasto e também por ferramentas moleculares (HU, 2004). Além disso, são unicelulares, não apresentam nenhuma diferenciação celular significativa e algumas espécies são capazes de formar colônias (SANTOS, 2014).

Os microrganismos pertencentes ao domínio Bacteria, representado por cianobactérias (denominados anteriormente como algas azuis), são também microrganismos fotossintetizantes, unicelulares, que encontram-se como células solitárias, filamentos ou colônias. No entanto, apresentam estrutura celular procarionte, o que é diferencia das microalgas (AZEVEDO; VASCONCENLOS, 1998). Elicker et al. (2015) apresentaram o potencial de alguns gêneros como *Phormidium*, *Pseudoanabaena* e *Synechococcus* na produção do biodiesel, com destaque à *Pseudoanabaena* pelo elevado teor lipídico.

Além das cianobactérias, as microalgas do domínio Eukarya, representadas por *Chlorophyta*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta*, *Haptophyta*, *Heterokontophyta*, *Chrysophyceae*, *Xantophyceae*, *Cryptophyta* e *Dinophyta* possuem em sua composição lipídios, proteínas e pigmentos considerados essenciais para a produção de biocombustíveis (BICUDO; MENEZES, 2006; LEE, 2011).

O metabolismo das microalgas é denominado fotoautotrófico, quando utiliza a luz como fonte de energia e o carbono inorgânico na forma de CO₂ para síntese de energia química (HUANG et al., 2010). Entretanto, algumas espécies de microalgas podem apresentar o metabolismo heterotrófico, que utiliza o carbono orgânico para síntese de energia e também como fonte de carbono (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004).

As microalgas fotoautotróficas são capazes de assimilar o carbono e converter o CO₂ em biomoléculas, como carboidratos e ácido graxos (CHEN; JIANG, 2017). Além disso, devido a sua estrutura simples e por viverem em meio líquido, a troca de água, CO₂ e de nutrientes são considerados mais eficientes quando comparado às plantas superiores, apresentando alta taxa de conversão de energia solar em biomassa (SANTOS, 2014).

Já em cultivos denominados mixotróficos, além da fotossíntese, são assimilados compostos orgânicos como uma fonte de carbono para o seu crescimento, o que faz com que possam sobreviver em ambientes adequados para metabolismos tanto fotoautotrófico quanto heterotrófico ou em ambos (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Segundo Teles (2016), os mixotróficos têm demonstrado várias opções como fonte de energia, pois além de utilizarem os compostos orgânicos e a luz como fonte de energia, utilizam também o carbono, compostos inorgânicos e orgânicos. Assim, os compostos orgânicos como glicose e ácidos graxos de cadeia curta presentes em águas residuais podem proporcionar o crescimento de microalgas mixotróficas (ZHANG et al., 2014). Por isso, os efluentes agroindustriais como a vinhaça podem ser eficazes para o cultivo de microalgas, atuando como uma importante fonte de nutrientes para o crescimento, além de contribuir para a redução da carga orgânica a ser descartada no corpo d'água (TELES et al., 2015).

As microalgas podem ser cultivadas em água marinha, doce e residuária, apresentando como vantagem a alta produtividade por área e ciclo de crescimento rápido quando comparado às culturas oleaginosas (WU et al., 2012). Tais características

possibilitam o cultivo em diversos sistemas e volumes, desde sistemas em escalas laboratoriais a tanques abertos com milhões de litros (BOROWITZKA, 1999). Além disso, as microalgas sintetizam amido e lipídios, macromoléculas que são matéria prima para produção de biocombustíveis (CHEAH et al., 2016; CAI; PARK; LI, 2013; DECOSTERE et al., 2016), apresentando capacidade de remoção de nutrientes das águas residuárias como uma forma de biorremediação (OLGUÍN, 2003). Isso promoveu o aumento das pesquisas para aplicação das microalgas no tratamento de águas residuárias e produção de biocombustíveis como um processo integrado, visando melhorias econômicas e ambientais (CHEAH et al., 2016; CAI; PARK; LI, 2013; DECOSTERE et al., 2016).

2.2.1. Composição microalgal

O carbono, nitrogênio e fósforo são os principais elementos que compõe as células microalgais, representando cerca de 50%, 7 a 10% e 1%, respectivamente, em seu peso seco (RICHARDSON et al., 1969; HU, 2013; GOLDMAN, 1980). A porcentagem do carbono em sua composição pode ser determinada pela combinação dos elementos biomoleculares como proteínas, lipídios e carboidratos. Já os nitrogênios são reservados em proteínas, e os fósforos em fosfolipídios e em ácidos nucleicos (GEIDER; LAROCHE, 2002; STERNER; ELSER, 2002). Portanto a relação da composição química das microalgas pode ser dita como um reflexo direto da composição biomolecular (FINKEL et al. 2016).

O nitrogênio é o elemento que constitui os aminoácidos, proteínas, enzimas, coenzimas e nucleotídeos, elementos importantes no metabolismo celular e por isso a sua presença nas células microalgais é considerada essencial (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014; RIGANO et al., 1998). Já o fósforo é um importante elemento para o crescimento celular das microalgas (HU, 2013), pois participa de processos metabólicos como, reprodução e transporte de nutrientes e processos bioenergéticos como processamento e armazenamento de informações genéticas da célula, atuando nas moléculas de DNA e RNA (MARONEZE et al., 2014).

A composição biomolecular das microalgas pode ser dividida em grandes grupos principais, sendo carboidratos, lipídios e proteínas. Já segundo Hu (2013), as microalgas das espécies *Chlorella* sp., *Botryococcus braunii* e *Dunaliella salina* podem apresentar composição química de 20 a 40% de carboidratos, 8 a 15% de lipídios e 30 a 50% de

proteínas em condições de cultivo favoráveis ao crescimento. Fatores como iluminação, temperatura, disponibilidade de nutrientes, etc., podem interferir diretamente na produtividade da biomassa, e também afetar as atividades metabólicas da célula e sua composição celular (HU, 2013). Além disso, esse conteúdo pode alterar de acordo com o gênero e espécie da microalga (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014), conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição biomolecular das microalgas e cianobactérias.

Espécies	Composição (% peso seco)			Referências
	Proteínas	Lipídios	Carboidratos	
<i>Anabena cylindrica</i>	43 – 56	4,0 – 7,0	25 – 30	Becker (2013)
<i>Chlorella</i> sp.				
<i>Botryococcus braunii</i>	30 - 50	8 - 15	20 - 40	Hu (2013)
<i>Dunaliella salina</i>				
<i>Chlorella vulgaris</i>	51 – 58	14 – 22	12,0 – 17,0	Mata; Martins; Caetano (2010)
<i>Dunaliella salina</i>	57	2	26	Gouveia et al. (2008)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	48	15	27	Batista et al. (2007)
<i>Prymnesium parium</i>	28 – 45	22 – 38	25 – 33	Bruton (2009)

Fonte: KOYANDE et al. (2019) – adaptado.

Os carboidratos são encontrados na parede celular das microalgas, as quais são à base de celulose e o seu principal composto de armazenamento é o amido (TELES, 2016). É um composto que apresenta facilidade para o seu armazenamento, além de ser eficiente para a fotoconversão (YEN et al., 2013). Segundo Koyande et al. (2019), os carboidratos podem ser monossacarídeos que incluem glicose, frutose, manose e galactose, ou polissacarídeos que incluem o amido e celulose. O amido apresenta uma

qualidade nutricional que faz com que se destaque entre os carboidratos, pois apresenta em sua estrutura química dois polímeros, sendo um polissacarídeo denominado amilose e outro denominado amilopectina, formando uma estrutura única diferenciada (FENNEMA,1996).

Os polissacarídeos hidrolizados formam os açúcares redutores, elemento com potencial aplicação para produção de bioetanol (FU et al.,2010; SUN; CHENG, 2002). A elevada relação C/N pode contribuir para o acúmulo de carboidratos, um importante elemento para produção de bioetanol, pois a quantidade de amido e a glicose extraídos têm influência direta no rendimento da produção de biocombustíveis (CHOCHOIS et al. 2009; ZHU et al., 2014).

Quanto aos lipídios, as microalgas são consideradas como uma das melhores opções para a produção de biodiesel devido ao alto teor apresentado em sua composição. Os lipídios são formados principalmente por ácidos graxos de cadeia longa (ANDRADE, 2014), e algumas espécies podem apresentar cerca de 30 a 50% de lipídios em seu peso total (CHEW et al. 2017). Entretanto, em cultivos realizados em efluentes, o conteúdo lipídico pode ser menor devido à alta concentração de nutrientes do meio. Porém, esta situação pode ser diferente quando as microalgas são submetidas a condições de estresse, o que promove o acúmulo de lipídios, podendo chegar a apresentar cerca de 70 a 90% da sua matéria seca (LI et al., 2008; HU et al., 2008).

Os lipídios são compostos por carbono, hidrogênio e oxigênio, sendo solúveis em solventes orgânicos e insolúvel em água (TINDALE, 1988). São encontrados principalmente os triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres e os fosfolipídios classificados como lipídios polares (KWIETNIEWSKA et al., 2012). Os lipídios utilizados para a produção de biodiesel são constituídos por ácido graxo saturado sem ligações duplas na cadeia de hidrocarbonetos, sendo formado por 14 a 19 cadeias de átomos de carbono (KOYANDE et al., 2019).

Já as proteínas são responsáveis pelo crescimento celular das microalgas, relacionado com a fase logarítmica do crescimento microalgal. *Euglena gracilis* e *Porphyridium* podem apresentar cerca de 30 a 60% de proteína em seu peso seco (ANDERSEN, 2013). As proteínas são formadas por um ou mais polipeptídeos através de ligações peptídicas, ou seja, 20 ou mais aminoácidos ligados entre si formam os polipeptídeos que se ligam através de ligação covalente entre carbono e nitrogênio, formando compostos orgânicos de alto peso molecular (ANDRADE, 2014). As

proteínas estão relacionadas com algumas funções fisiológicas, portanto são considerados elementos essenciais para os processos que envolvem o crescimento e reprodução das microalgas (BOBBIO; BOBBIO,1995). Alta concentração de proteínas indica elevado teor de nitrogênio no meio que pode ser armazenado, para o uso posterior por alguns organismos. Quando o nitrogênio estiver limitado no ambiente, essas proteínas de armazenamento são digeridas para liberação do nitrogênio (ANDERSEN, 2013). Esse processo pode ser considerado como negativo, pois elevadas concentrações de nitrogênio podem ser prejudiciais para realização da digestão anaeróbia.

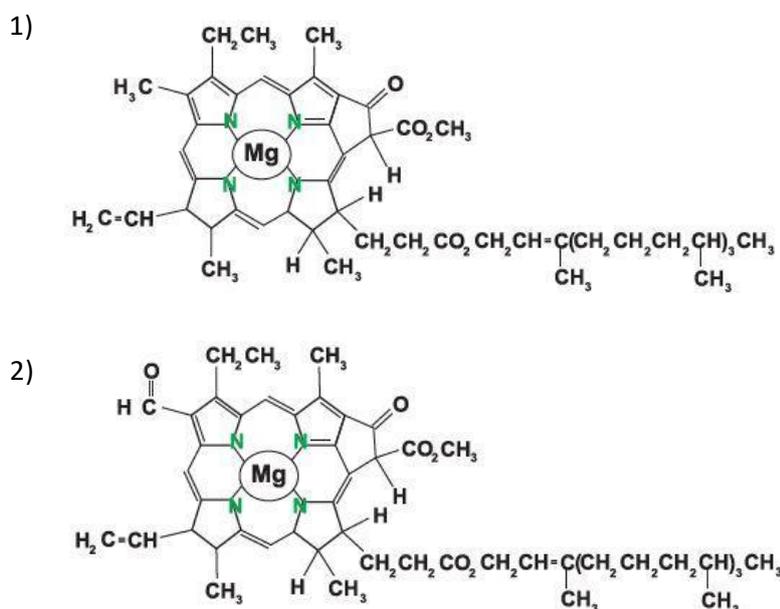
Além dos elementos citados existem os pigmentos que constituem o sistema fotossintético das microalgas, os quais são compostos químicos que captam a energia por meio da absorção da luz, como as clorofilas encontradas em todas as plantas e algas (SPOLAORE et al., 2006). As clorofilas são pigmentos encontrados em algas e bactérias aquáticas fotossintetizantes, e segundo Nakanishi (2001), as microalgas podem acumular 4% de clorofila em seu peso seco. São lipídios polares que tem como produto de reserva o amido, e fazem com que as células das microalgas pertencentes ao grupo Chlorophyta tenham coloração verde devido à presença de clorofila *a* e *b*. (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014).

As clorofilas apresentam moléculas complexas formadas por 4 anéis pirrólicos e um anel isocíclico ligados por ponte de metilênicas, estrutura conhecida como porfirina, conforme Figura 1. Essa estrutura conta com um átomo de magnésio, o qual a partir da sua forte ligação com os anéis pirrólicos proporciona a rigidez para a estrutura absorver a energia luminosa sem ser prejudicada por movimentos eletrônicos (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014). Além disso, estão associadas às proteínas e são acompanhadas por carotenoides, que tem como função a absorção da luz para realização da fotossíntese e proteção das células contra excesso de luminosidade (DAILEY, 1990; HENDRY; HOUGHTON, 1996; MIKI, 1991).

A clorofila pode ser classificada em clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila *c*, clorofila *d* e clorofila *e*. No entanto, as clorofilas *a* e *b* são os principais pigmentos encontrados em plantas superiores (SHEER, 1991; BECHTOLD; MUSSAK, 2009), sendo que a clorofila *a* corresponde a 75% dos pigmentos verdes (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014). A diferença entre a estrutura molecular da clorofila *a* e *b* é que na clorofila *b* o

segundo anel pirrólico apresenta um grupo aldeído, ao invés do grupo metil (STREIT et al., 2005).

Figura 1 - Estrutura molecular das clorofilas *a* (1) e *b* (2).



Fonte: DAILEY (1990); GROSS (1991).

Para que ocorra a conversão da radiação solar em energia química através da fotossíntese é imprescindível a presença da clorofila, no entanto são moléculas que apresentam alta decomposição em ambientes com intensa luminosidade, situação denominada de foto-oxidação (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014).

De acordo com Piorreck, Baasch e Pohl (1984) a produtividade de clorofila pode sofrer alterações de acordo com a concentração de nitrogênio. Os autores relatam que, o aumento do nitrogênio no meio de cultivo proporcionou um aumento da concentração de clorofila na microalga *Spirulina platensis*. E Syrett (1992) relatou o inverso, o qual identificou redução na taxa fotossintética da microalga *Chlorella* sp. quando o meio de cultivo sofreu uma redução na concentração de nitrogênio, confirmando o relato de Piorreck, Baasch e Pohl (1984).

A clorofila deve ser considerada como uma medida indireta para quantificação da biomassa algal, pois as condições ambientais de cultivo podem causar alterações no conteúdo de clorofila, podendo acumular menos ou mais pigmento. Além disso, existem

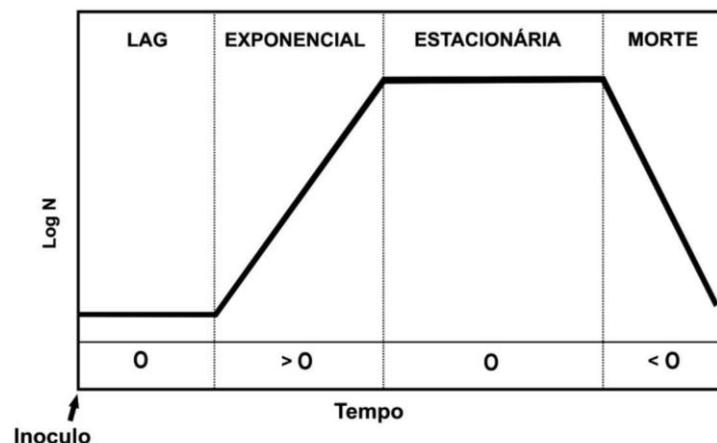
espécies que não apresentam a pigmentação esverdeada em seu conteúdo, necessitando de cuidados para sua avaliação (RICHMOND, 2013).

Além da clorofila, a maioria das microalgas apresentam também os carotenoides. Essas substâncias são no geral sintetizadas dentro dos plastídeos, acumulando em seu interior (ABURAI et al., 2013; SPOLAORE et al., 2006), e podem também apresentar altos níveis de vitaminas, oligoelementos e ácidos graxos poliinsaturados em sua composição, os quais são considerados como elementos essenciais para as microalgas (CHEW et al. 2017).

2.2.2. Curva de crescimento microalgal

Segundo Lee et al. (2013), o comportamento do crescimento das microalgas pode ser observado por meio das quatro fases de crescimento microalgal conforme apresentado na Figura 2. A primeira fase denominada *Lag* é a fase em que ocorrem os ajustes fisiológicos, considerado uma fase de adaptação. A segunda fase denominada Exponencial (ou logarítmica) é a fase em que as células já se adaptaram ao ambiente inoculado e iniciaram o seu crescimento e multiplicação. Na terceira fase denominada Estacionária, o meio de cultivo apresenta redução dos nutrientes disponíveis, e conseqüentemente a taxa de crescimento iguala a taxa de mortalidade (BORZANI, 2001). E por fim, a última fase denominada Morte, ainda de acordo com Borzani (2001) ocorre a lise celular ou o rompimento celular devido as ações das enzimas intracelulares, em consequência do esgotamento dos nutrientes

Figura 2 - Curva de crescimento microalgal.



Fonte: ARANA; ORRUÑU; BARCINA, (2013).

O crescimento das microalgas ocorre quando o meio de cultivo apresenta quantidade de nutrientes suficientes, considerados não limitantes e de forma favorável ao crescimento celular, onde o tempo necessário para duplicar o número de células viáveis é denominado tempo de duplicação (td). A relação do número de duplicações (n) em um período de tempo t é determinada por t/d, e sendo assim, a quantidade de células (Nt) de um cultivo na fase exponencial de crescimento após um período de tempo de inoculação pode ser definido pela equação 1 (LEE et al., 2013).

$$\ln \ln \left(\frac{N_t}{N_0} \right) = (\ln \ln 2) \frac{t}{td} \quad (1)$$

Segundo Arana, Orruñu e Barcina (2013), a taxa de crescimento específico (μ) representa o crescimento da biomassa por uma unidade de tempo (h), e para sua determinação é utilizada a equação 2.

$$\ln \ln N - \ln \ln N_0 = \mu(t - t_0) \quad (2)$$

Onde N representa UFC (unidade formadora de colônias) mL⁻¹ no tempo t, N0 representa UFC mL⁻¹ no tempo t0, t representa o tempo de cultivo e μ representa a constante da taxa de crescimento específico (h⁻¹).

Na fase exponencial de crescimento microalgal, a taxa de crescimento se mantém constante e atinge o seu valor máximo (μ máx), podendo ser determinado pela equação (3) que segue abaixo (SANTOS, 2014).

$$\ln \ln \frac{X}{X_i} = \mu \text{ máx}(t - t_i) \quad (3)$$

Onde μ máx é a velocidade máxima específica de crescimento da microalga, X e t representam a concentração de microalgas e tempo, respectivamente, e Xi e ti representam a concentração e tempo no início do cultivo, respectivamente (SANTOS, 2014). A determinação do μ máx é importante, pois a partir dele é possível observar o momento em que o cultivo deve ser interrompido, identificando o fim da fase do crescimento exponencial e início da fase estacionária e consequente decaimento do crescimento microalgal.

Para o cálculo da taxa de crescimento microalgal é preciso uma série temporal de observações e resultados. Para isso, pode ser aplicado o número de células observados através da contagem acrescido da concentração de clorofila, proteína, lipídio, etc., dados que podem ser correlacionadas com o número de células para cálculo da taxa de crescimento ou da biomassa algal (WOOD; EVERROAD; WINGARD, 2005).

Diversos estudos avaliaram o crescimento microalgal na vinhaça e são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores de taxa de crescimento específico (μ) encontrados ao cultivar em vinhaça, com diferentes diluições.

Espécie	Sistema de cultivo	Concentração da vinhaça (%v/v)	μ (d ⁻¹)	Referência
<i>Chlorella</i> sp. (D101Z)	Biorreator de crescimento	100	0,36	CALIXTO et al., (2016)
<i>Chlamydomonas</i> sp. (D132WC)	suspensão (5 L)		0,74	
<i>Micractinium</i> sp. (ME05)	Biorreator (500 mL)	2 10 20	0,92 1,01 0,97	ENGIN et al., (2018)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Biorreator (600 mL)	25 50 100	0,1 0 0	MARQUES et al., (2013)

Fonte: Do autor (2021).

No estudo desenvolvido por Calixto et al (2016) foram verificados o potencial de desenvolvimento das microalgas *Chlorella* sp. (D101Z), *Chlamydomonas* sp. (D132WC), *Lagerheimia longiseta* (D133WC) e *Pediastrum tetras* (D121WC) em diversos meios (bio-compostos de resíduos de frutas, vinhaça, excrementos de galinha, esterco de galinha cru e esgoto doméstico municipal) a partir da avaliação do crescimento celular e biomassa. Os autores relataram que, somente a *Chlorella* sp. e *Chlamydomonas* sp. foram capazes de se desenvolverem em meio com vinhaça,

podendo ser explicado pela presença de compostos fenólicos e melanoidínicos que podem ser encontrados na vinhaça serem tóxicos para algumas espécies.

Já Engin et al (2018) realizaram cultivo de *Micractinium* sp. (ME05) em biorreatores de 500 mL utilizando a vinhaça como fonte de nutrientes, e verificaram que as produtividades de biomassa foram melhores em condições mixotróficas do que em condições heterotróficas. Além disso, ao ampliar o biorreator para 2 L, identificaram um aumento de 1,7 vezes na produtividade de biomassa, confirmando que *Micractinium* sp. (ME05) apresenta viabilidade de produção de biomassa e lipídios em cultivos de grande escala utilizando a vinhaça.

Marques et al (2013) avaliaram o potencial de uso da vinhaça tratada anaerobicamente como uma fonte de nutrientes para o cultivo de microalgas, e a partir dos resultados concluíram que é possível integrar o cultivo de microalgas com a indústria canavieira a partir da introdução do tratamento anaeróbio da vinhaça, possibilitando até mesmo no aproveitamento dos subprodutos para geração de energia.

2.2.3. Produção de biomassa algal

A contagem das microalgas é um processo importante para acompanhar o desenvolvimento celular, pois a partir dela é identificado o tempo ideal para a interrupção do cultivo e coleta da biomassa cultivada (SANTOS, 2014). Os métodos mais utilizados para a quantificação das células microalgais são: contagem por microscopia, espectrofotometria e fluorescência (GIORDANI, 2018).

A contagem por microscopia é um método de contagem direta realizada manualmente, utilizando a câmara de Neubauer. A câmara conta com linhas que se dividem em 5 quadrantes, com volume total de 0,02µL. Os quadrantes são subdivididos em 16 subcompartimentos, o que totaliza 80 compartimentos (KASVI, 2017). Para contagem de células por mL de cultivo, a amostra contendo as microalgas em suspensão deve ser pipetada e introduzida entre a câmara e a lâmina, e visualizada através do microscópio óptico para a contagem (SARRAFZADEH et al., 2015).

Já o método de contagem por espectrofotometria é realizado através do espectrofotômetro, onde a absorbância da amostra coletada é convertida em concentração celular (GIORDANI, 2018). Esse método de contagem é classificado como indireto, e tem como vantagem a possibilidade de determinação da densidade celular por meio da passagem do comprimento de onda pela amostra. Porém é

necessário ter uma curva de calibração construída previamente, a partir da equação 4, da Lei de Beer-Lambert, onde a densidade óptica do material é proporcional a quantidade de matéria absorvente, em que é observado a absorção de luz de uma certa solução de forma proporcional à concentração molecular do soluto em que se encontra (HAVLIK et al., 2013).

$$A_{\lambda} = \epsilon * l * c \quad (4)$$

A Lei de Beer-Lambert é constituída por A_{λ} que representa a absorbância da amostra, ϵ que representa o coeficiente de extinção ($\text{cm}^2 \text{ célula}^{-1}$), l que representa o caminho (cm) e c que representa a concentração celular (cel ml^{-1}) (BETTIN, 2014).

Por fim, o método de fluorescência, conhecida também como Citometria de fluxo, é um método de quantificação celular através da fluorescência. Este método tem como vantagem a identificação das microalgas por meio da sua fluorescência, o que possibilita na distinção das microalgas das matérias orgânicas e classificação por população. No entanto, tem como desvantagem o seu alto custo e dificuldades para operação (GIORDANI, 2018).

Além dos métodos citados, tem-se o método de contagem por imagem. Este método consiste na contagem das células microalgais a partir de uma câmera acoplada ao microscópio, o qual a imagem pode ser transmitida a um computador. Com este método existe a possibilidade de realizar a contagem de forma automática, por meio de um software com linguagem desenvolvida para tal fim (GIORDANI, 2018). O software Countess por exemplo, foi desenvolvido para analisar a imagem do microscópio capturado pela câmera e contabilizar as células a partir da área ocupada por elas (SARRAFZADEH et al., 2015). O método de contagem automática tem como vantagem em relação ao método de contagem manual, a rapidez e precisão, possibilitando na redução de erros e aumento na contagem de amostras (BROWN et al., 1989; JACKSON et al., 1984).

Para melhor estimativa da taxa de crescimento microalgal, valores de sólidos suspensos voláteis (SSV) e de clorofila *a* podem ser analisados em conjunto com a contagem. Os sólidos suspensos indicam os materiais em suspensão presente no efluente utilizado como meio de cultivo. A partir da análise de sólidos é possível quantificar a biomassa presente no meio de cultivo a partir dos sólidos suspensos

voláteis (SSV), o qual indica a quantidade de biomassa total representada pela presença de microrganismos, bactérias e outros organismos (MANUAL DE ANÁLISES LABORATORIAIS, 2019). Em esgoto bruto por exemplo, podemos dizer que a matéria orgânica particulada representa a concentração de SSV. No entanto, ao passar por tratamento, a matéria orgânica sofre a degradação, podendo considerar que o SSV neste caso é representado pela biomassa total encontrada no efluente.

Já a análise de clorofila *a* consiste em extrair a clorofila *a* da biomassa, e determinar a sua concentração por espectrofotometria. De acordo com Veloso et al. (1991) a razão entre clorofila *a* e SSV pode ser um indicador do estado da cultura, onde valores abaixo de 1% representam biomassa algal que sofreu estresse devido a predação e competição, e valores entre 1 e 1,5% mostram a presença de células de microalgas saudáveis no cultivo.

2.3. Fatores que influenciam o cultivo de microalgas

2.3.1. Nutrientes

Dentre os diversos nutrientes presentes na água existem os que são classificados como micronutrientes e macronutrientes. Os micronutrientes influenciam nas atividades e estruturas das enzimas metabólicas e no arranjo das organelas como os ribossomos (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014). Já os macronutrientes exercem funções como regulação das atividades metabólicas, auxilia no processo de troca de energia, constituem a estrutura das membranas, entre outras atividades que são de extrema importância para o crescimento das microalgas (LOURENÇO, 2006).

A classificação ocorre de acordo com a quantidade requerida pelas microalgas, onde os elementos como carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, silício, potássio, fósforo, sódio, cálcio, enxofre e ferro são denominados macronutrientes, e zinco, boro, cobre, manganês e molibdênio são os micronutrientes (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014). A Tabela 4 apresenta os macronutrientes considerados importantes para o cultivo das microalgas, suas respectivas formas encontradas na natureza e suas formas químicas fornecidas no meio de cultivo.

O hidrogênio pode ser assimilado através da oxidação da molécula de água por meio da fotossíntese, e apesar do elevado teor na composição microalgal não é considerado como um fator limitante de crescimento. Quanto ao oxigênio é considerado elemento essencial para as atividades respiratórias das microalgas, porém em ambientes

com elevado teor de matéria orgânica pode se tornar um fator limitante para o crescimento (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014).

Tabela 4 - Macronutrientes importantes para o cultivo das microalgas.

Macronutrientes	Forma na natureza	Forma fornecida	Forma assimilável pelas microalgas
Carbono	CO ₂ , compostos orgânicos	Glicose, malato, acetato, etc.	CO ₂ , CO ₃ ⁻ , HCO ₃ ⁻ , carbono orgânicos
Nitrogênio	NH ₃ , NO ³⁻ , N ₂ , compostos orgânicos nitrogenados	NH ₄ Cl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , KNO ₃ , N ₂ , aminoácidos, etc.	NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , NH ₄ ⁺
Fósforo	PO ₄ ³⁻	KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄	PO ₄ ³⁻ , H ₂ PO ₄ ⁻ , HPO ₄ ²⁻
Hidrogênio	H ₂ O, compostos orgânicos	H ₂ O, compostos orgânicos	H ₂ O
Oxigênio	H ₂ O, O ₂ , compostos orgânicos	H ₂ O, O ₂ , compostos orgânicos	H ₂ O, O ₂ ,
Ferro	Fe ²⁺ , Fe ³⁺ ou sais de Fe	FeCl ₃ , FeSO ₄ , Fe ³⁺ EDTA (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	-
Potássio	K ⁺ em solução ou sais de K	KCl, KH ₂ PO ₄	-
Enxofre	H ₂ S, SO ₄ ²⁻	Na ₂ SO ₄ , Na ₂ S ₂ O ₃ , Na ₂ S, etc.	SO ₄ ²⁻
Magnésio	Mg ²⁺ em solução ou sais de Mg	MgCl ₂ , MgSO ₄	-
Sódio	Na ⁺ em solução ou sais de Na	NaCl	-
Cálcio	Ca ⁺ em solução ou sais de Ca	CaCl ₂	-

Fonte: ANDRADE (2014) – adaptado.

2.3.1.1. Carbono

O carbono é considerado como o macronutriente mais importante para o desenvolvimento das microalgas (LOURENÇO, 2006). O carbono inorgânico em meio aquoso pode ser encontrado em diferentes formas, como dióxido de carbono (CO₂), carbonato (CO₃⁻) ou bicarbonato (HCO₃⁻), onde cada um apresenta uma contribuição para o crescimento das microalgas (MOHEIMANI, 2012).

A assimilação do carbono inorgânico é realizada por meio da fotossíntese devido ao metabolismo fotoautotrófico das microalgas conforme reação que segue abaixo (SASI, 2009; LIANG; SARKANY; CUI, 2009).



No entanto, algumas espécies de microalgas são capazes de utilizar o carbono orgânico como fonte de energia e também como fonte de carbono, as quais são denominadas heterotróficas (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004). Além disso, existem as microalgas mixotróficas que são capazes de realizarem a fotossíntese e assimilar o carbono orgânico como fonte de carbono (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010), e as fotoheterotróficas que utilizam os compostos orgânicos como fonte de carbono e necessitam da luz como fonte de energia (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004).

Em geral as microalgas utilizam o CO₂ como fonte de carbono, no entanto, em condições com o pH entre 6,5 a 10, o bicarbonato pode ser a forma dominante de carbono (HOH; WATSON; KAN, 2016). Já em pH ácidos a fonte de carbono utilizada pelas microalgas é o CO₂, onde a sua disponibilidade é maior (ANDRADE, 2014).

Segundo Arbib et al. (2013) e Valdés et al (2012), em período com intensa luminosidade as microalgas apresentam maior intensidade de fotossíntese e assimilação de CO₂, processo que ocasiona o aumento do pH do meio. O pH sobe, pois há o consumo de CO₂ pela fotossíntese das algas. Logo, quando ele é assimilado pela fotossíntese, as algas retiram acidez do meio e o pH sobe (BERENGUEL et al. 2004). Além disso, o pH pode se elevar devido a desidratação do íon bicarbonato para formação do CO₂ e íons OH⁻, provocado pelo metabolismo autotrófico das microalgas (SHIRAIWA et al., 1993).

A relação carbono/nitrogênio (C/N) do efluente doméstico geralmente é de 3:1, o qual contém apenas metade da quantidade de carbono necessário para que as microalgas sejam capazes de assimilar o nitrogênio, que é de aproximadamente 6:1. Já a vinhaça apresenta uma relação C/N entorno de 20 (JOHNSON et al., 2019) e 9,3 mg L⁻¹ de carbono em sua composição (ZOLIN et al., 2011), o que pode ser considerado como uma vantagem para assimilação de nutrientes e acúmulo de lipídios pelas microalgas.

No entanto, a adição de CO₂ no meio de cultivo reduz a limitação do carbono, contribuindo para o aumento da produtividade das microalgas e melhoria da eficiência do tratamento do efluente (HEUBECK; CRAGGS, 2007; HEUBECK; CRAGGS; SHILTON, 2007; PARK; CRAGGS, 2010; PARK; CRAGGS, 2011), além da assimilação dos compostos nitrogenados e redução do pH do meio (CRAGGS; SUTHERLAND; CAMPBELL, 2012).

Há diversos estudos que tratam injeção de CO₂ no meio de cultivo como um nutriente que auxilia no crescimento das microalgas (DARVEHEI; BAHRI; MOHEIMANI, 2018). No estudo desenvolvido por Lee e Zhang (2016), quando a concentração de CO₂ do meio atingia valores abaixo de 50 mg L⁻¹, o CO₂ era injetado como uma forma de nutriente para o crescimento das microalgas. Já Sutherland et al. (2015) apresentam em seu estudo o efeito da adição do CO₂ em efluente doméstico para cultivo de microalgas, onde obtiveram o aumento na concentração de clorofila *a* em até 96%. Isso se deve ao fato de que a adição de CO₂ proporcionou aumento na eficiência da assimilação do carbono inorgânico e da luz pelas microalgas, apresentando aumento na taxa máxima de transporte de elétrons e realização de fotossíntese. Neste processo de adição de CO₂, o pH pode ser utilizado como um parâmetro de controle, pois conforme mencionado anteriormente, de acordo com o aumento da fotossíntese realizado pelas microalgas o pH sofre aumento, representando o consumo de CO₂ pelas microalgas.

2.3.1.1.1. Matéria Orgânica

A demanda química de oxigênio (DQO) é um parâmetro que indica a quantidade de orgânicos presentes nas águas e por isso é frequentemente utilizada para o monitoramento da qualidade das águas oriundas de estação de tratamento de esgoto (AQUINO; SILVA; CHERNICHARO, 2006). Na resolução CONAMA 430/11 que dispõe sobre os padrões de lançamento de efluentes não é estabelecido valores para a DQO, no entanto em alguns estados são apresentadas legislações ambientais que

determinam limites máximo de DQO para o lançamento do efluente em um corpo hídrico (AQUINO; SILVA; CHERNICHARO, 2006).

Na deliberação normativa conjunta COPAM/CERH-MG 01 de 2008, por exemplo, são estabelecidos valores de DQO para lançamento de efluente de qualquer fonte poluidora em corpos d'águas. Para sistemas de esgotos sanitários e percolados de aterros sanitários é permitido até 180 mg L⁻¹ ou a remoção de até 55% de DQO, com média anual igual ou superior a 65% de remoção. Para os demais sistemas é estabelecida a redução de no mínimo 70% com média anual igual ou superior a 75%, além de que efluentes de indústria têxtil é determinado o padrão de lançamento de 250 mg L⁻¹. Em âmbito europeu, o Conselho das Comunidades Europeias - Council of the European Communities determinou a partir da Deliberação n° 91/271/EEC de 21 de maio de 1991, a concentração de DQO para efluentes domésticos e industriais tratados inferior a 125 mg L⁻¹ ou eficiência de remoção de 75%.

A DQO é calculada a partir da quantidade de oxigênio dissolvido consumido para oxidação química da matéria orgânica biodegradável ou não (VALENTE; PADILHA; SILVA, 1997), e a sua determinação pode ser por meio de método titulométrico ou colorimétrico, o qual irá realizar a medição indireta dos elementos que apresentam baixo teor de oxidação no meio (AQUINO; SILVA; CHERNICHARO, 2006).

A DQO pode ser classificada em 4 tipos: solúvel rapidamente biodegradável constituída por partículas biodegradáveis pequenas metabolizadas em um período curto (ex: ácidos orgânicos, aminoácidos, etc.); solúvel lentamente biodegradável; particulada biodegradável que é constituída por partículas maiores que requerem hidrólise extracelular, levando mais tempo para sua metabolização; e por fim, a solúvel não biodegradável que é constituída por diversos compostos dissolvidos acessíveis ao interior da célula microbiana porém não-biodegradável (HENZE, 1992; HENZE et al., 1987; WENTZEL et al., 1999; HU et al., 2002; DULEKGURGEN et al., 2006).

De acordo com Aquino, Silva e Chernicharo (2006) no geral, em efluentes domésticos são identificados maior fração orgânica em relação a fração inorgânica, o que viabiliza a quantificação de DQO por meio da matéria orgânica oxidável. No entanto, a relação COT/DQO, que apresenta o carbono orgânico total dividido por DQO foi proposta para quantificação precisa de remoção da matéria orgânica por meio do número médio de oxidação de carbono (Vogel et al., 2000).

A vinhaça é composta principalmente por matérias orgânicas (ARAÚJO; OLIVEIRA, 2016). São relatados valores de DQO que variam de 27.500 – 299.250 mg L⁻¹ e DBO de 5.046 – 47.636 mg L⁻¹ (PARSAEE; KIANI; KARIMI, 2019), sendo um dos efluentes com maior carga poluidora na indústria sucroalcooleira (DA SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007; ROSSETO, 1987).

Já o oxigênio dissolvido (OD) representa a concentração de oxigênio dissolvido na água em mg L⁻¹ (VALENTE; PADILHA; SILVA, 1997). A quantidade de OD do meio de cultivo pode variar de acordo com a intensidade da fotossíntese, no qual quanto maior a fotossíntese maior será o nível de OD (GARCÍA; MUJERIEGO; HERNANDEZ-MARINE, 2000; MOLINA et al., 2001; PARK; CRAGGS, 2010).

De acordo com Jia e Yuan (2016), as microalgas apresentam uma interação de troca com as bactérias, onde as microalgas produzem oxigênio para as bactérias em sistemas aquáticos naturais atuando como reservatório para fixação de CO₂, o que indica o potencial simbiótico entre os microrganismos para o tratamento de efluentes. As concentrações de DQO podem ser reduzidas de acordo essa simbiose, ou seja, pela respiração dos organismos heterotróficos que realizam a mineralização do carbono orgânico juntamente com o consumo de OD (SHEN; GAO; LI, 2017). No entanto, em ambientes com elevada concentração de matéria orgânica, como efluentes agroindustriais, pode haver o favorecimento do crescimento das bactérias em detrimento das microalgas, devido ao ambiente ser propício para o metabolismo heterotrófico.

De acordo com Molina et al. (2001), o valor da taxa de geração de oxigênio sob o valor da concentração de biomassa algal no estado de crescimento estacionário determina a atividade fotossintética, o qual em situação de saturação de OD no meio de cultivo foi reduzida em 17-25%. Acredita-se que o elevado nível de OD pode ocasionar redução na atividade fotossintética, inibindo o crescimento das microalgas (WEISSMAN; GOEBEL, 1987; MOLINA et al., 2001). Porém Park, Craggs e Shilton (2011) acreditam que ainda são necessários estudos para identificar melhor tal influência do nível de OD no crescimento das microalgas em meios de cultivos provenientes de águas residuárias.

2.3.1.2. Nitrogênio

O nitrogênio pode ser considerado como o segundo nutriente mais importante para o desenvolvimento das microalgas e produção da biomassa, perdendo apenas para

o carbono (GROBBELAAR, 2013). A baixa concentração de nitrogênio no meio de cultivo pode provocar a sintetização preferencial dos lipídios e carboidratos (RIGANO et al., 1998).

O nitrogênio é fornecido principalmente na forma de nitrato (N-NO_3^-), nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+) e uréia. A assimilação do nitrato ou amônia dependerá do pH do meio do cultivo, o que influencia na sua disponibilidade, no entanto o íon amônia é a fonte de nitrogênio preferível pelas microalgas, além de ser a fonte predominante. (KAPLAN et al., 1986; GROBBELAAR, 2013).

De acordo com o Cornet, Dussap e Gros (1998) quando a fonte de nitrogênio se encontra na forma de nitrato é necessário que as microalgas realizem a redução deste íon através da enzima nitrato-redutase, seguido de outra redução através da enzima nitrito-redutase, formando a amônia. Além disso, a produção de oxigênio pela fotossíntese pode possibilitar o desenvolvimento de bactérias nitrificantes no consórcio de microrganismos e a consequente conversão de nitrogênio amoniacal à nitrito e posteriormente à nitrato.

O aumento da densidade microalgal ocasiona a redução do CO_2 do meio de cultivo devido a atividade fotossintética, processo no qual provoca a elevação do pH e formação de amônia livre devido a dissociação do íon amônio (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014). A alta concentração de amônia livre no meio com elevado pH pode ser considerada como um desequilíbrio para as microalgas, podendo ser um fator inibidor de crescimento (AZOV; GOLDMAN, 1982). O NH_3 é tóxico para diversos organismos aquáticos, pois pode causar desestabilização no sistema de osmorregulação devido as dificuldades nas trocas gasosas entre o animal e a água.

A vinhaça apresenta em sua composição, concentrações de N-NO_3^- , N-NH_4^+ e NTK (nitrogênio total Kjeldahl) que variam de $441 - 650 \text{ mg L}^{-1}$, $24 - 45 \text{ mg L}^{-1}$ e $40 - 4.000 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente (DEL NERY et al., 2018; PARSAEE; KIANI; KARIMI, 2019). A concentração de nitrogênio no meio de cultivo pode influenciar diretamente no conteúdo lipídico e produção da biomassa microalgal. Segundo Macedo e Alegre (2001), o aumento do conteúdo lipídico de *Spirulina* foi observado a partir da redução da concentração de N-NO_3^- do meio de cultivo. Syrett (1992) observou diminuição da taxa fotossintética de acordo com a redução da concentração de nitrogênio do meio, o que foi confirmado por Bertold, Sant'anna e Oliveira (2008), os quais relataram aumento do teor de clorofila quando o meio de cultivo apresentava elevada

concentração de nitrogênio. Assim pode-se dizer que, a disponibilidade de nitrogênio no meio de cultivo dependerá do fim de uso da biomassa algal cultivada, pois para cada concentração de nitrogênio, a microalga apresentará um comportamento de conteúdo lipídico e produtividade microalgal.

Em estudo sobre cultivo de *Scenedesmus obliquus* em água doce, foram realizados dois experimentos: um meio contava com concentrações de amônia livre de 34 g m³ e outro com 51 g m³. Todos os dois meios apresentavam pH = 9,5 e temperatura que variaram de 20 – 25 °C. Nesse experimento foi verificado uma redução da taxa de fotossíntese realizado pelas microalgas em 50% e 90%, respectivamente (AZOV; GOLDMAN, 1982). O valor elevado de pH pode proporcionar na volatilização da amônia livre presente no meio de cultivo, atuando na remoção do nitrogênio amoniacal (GARCÍA; MUJERIEGO; HERNANDEZ-MARINE, 2000; CRAGGS, 2005). Apesar do pH alto representar a ocorrência de fotossíntese pelas microalgas, e consequentemente representar um meio com alta concentração de biomassa algal (PARK; CRAGGS; SHILTON, 2011), a elevada concentração de amônia livre no meio pode ser prejudicial para as microalgas devido ao não aproveitamento energético como nutriente para o seu desenvolvimento, não ocorrendo a assimilação.

2.3.1.3. Fósforo

O fósforo é um macronutriente que contribui para a formação de componentes estruturais e funcionais, essencial para o desenvolvimento e reprodução das microalgas, além de desempenhar um papel importante para os processos metabólicos celulares (HU, 2013). É um elemento essencial para a síntese celular de fosfolipídios, nucleotídeos e ácidos nucleicos, no entanto são encontrados aproximadamente apenas 1% em sua base seca (MAROZENI et al., 2014).

Em meios aquáticos, o fósforo é encontrado na forma de fósforo total, formado pelo fósforo orgânico e inorgânico, o qual o fósforo orgânico é constituído por matéria orgânica dissolvida e particulada, e a forma inorgânica é representado pelas frações solúvel e insolúvel do fósforo (ARANTES, 2019). A fração solúvel é encontrada facilmente e é constituída pelos ortofosfatos (PO_4^{3-} , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}), fosfatos orgânicos e fosfatos condensados, no entanto, de acordo com a variação do pH podem assumir diferentes formas (CHAO, 2006).

Em meios ácidos são encontrados predominantemente o fósforo na forma de H_2PO_4^- , já em meios alcalinos as formas predominantes são PO_4^{3-} e H_2PO_4 (FAQUIN, 2005; NUVOLARI, 2011; PARRON; MUNIZ; PEREIRA, 2011). O pH elevado promove a remoção do fósforo através da precipitação do fosfato juntamente com a precipitação de cálcio, magnésio e ferro férrico não cálcio (GARCÍA; MUJERIEGO; HERNANDEZ-MARINE, 2000; CRAGGS, 2005).

De acordo com Belay (2013) em meio com elevado teor de cálcio e alumínio, o fósforo sofre a precipitação em forma de fosfato de cálcio ou fosfato de alumínio, podendo causar limitação da sua disponibilidade no meio e conseqüentemente interferir na produtividade da biomassa microalgal. A eficiência de remoção do fósforo varia de acordo com a concentração de nutrientes, da fração nitrogênio fósforo presente no meio de cultivo, intensidade luminosa ou até mesmo de acordo com a espécie da microalga cultivada (ASLAN; KAPDAN, 2006).

A remoção do fósforo do meio de cultivo pode ocorrer através da adsorção na biomassa, e estudos apontam que as microalgas apresentam capacidade de armazenar o fósforo em sua célula na forma de fosfato e utilizá-los em condições limitantes (VIEIRA et al., 2012). O fósforo é assimilado na forma oxidada e podem utilizar os açúcares fosfatados como fonte de nutriente (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014). A assimilação do fósforo pelas microalgas, no geral ocorre no início do período de crescimento microalgal e liberado ao meio de cultivo na fase do crescimento exponencial, diferentemente do nitrogênio, que é assimilado gradativamente ao longo do desenvolvimento (WATANABE; TANABE, 2013).

A concentração de fósforo na vinhaça varia de 1 – 190 mg L^{-1} , o que é considerado relativamente baixa (PARSAEE; KIANI; KARIMI, 2019; LYRA et al., 2003). Em esgoto doméstico, a concentração de fósforo varia na faixa de 6 - 10 mg L^{-1} , tendo uma relação média de N:P = 10:1. Esses valores podem variar de acordo com as condições socioeconômicas, o qual concentrações de urinas ou produtos industrializados a base de fósforo, como detergentes e sabão, são fatores que influenciam diretamente (CETESB, 2014; GREEN; FINLAY, 2010; CORRELL, 1999).

Kim et al. (2010) identificaram que espécie *Chlorella vulgaris* apresenta maior capacidade de crescimento e absorção de nitrogênio e fósforo presente no meio de cultivo, comparada à outras espécies. Já no estudo desenvolvido por Celekli e Yavuzatmaca (2009), foram realizados cultivos de *Spirulina platensis* em diferentes

concentrações de fosfato (0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 g L⁻¹) em diferentes pH (9,5, 10,0 e 10,5) para avaliar a influência da presença do fosfato no meio de cultivo. Assim, a maior produção de biomassa (3.099 g L⁻¹) foi identificada em meio com 0,5 g L⁻¹ de concentração de fosfato e pH 10,0.

2.3.2. Iluminação

A iluminação é a principal fonte de energia das microalgas, sendo um dos fatores mais importantes para o seu crescimento (SOLETTO et al., 2005), pois a quantidade recebida interfere diretamente na quantidade de carbono consumido, na produção de biomassa e também na taxa de crescimento microalgal (DERNER, 2006). De acordo com Dubinsky (1990), a fonte de luz pode ser classificada quanto ao tempo de exposição (fotoperíodo) e quanto a sua intensidade, de acordo com o comprimento de onda.

A faixa espectral da luminosidade preferida e absorvível pelos pigmentos fotossintetizantes das microalgas varia de 400 nm a 700 nm (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014). A eficiência máxima de conversão fotossintética das microalgas varia de 1,3% a 2,4% (BENEMANN, 2008; WALKER, 2009), e na maioria das espécies o crescimento pode ser inibido quando a intensidade luminosa atinge valores superiores a 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

A iluminação influencia diretamente na fotossíntese realizada pelas microalgas. Em condições de alta intensidade, pode ocasionar a fotoinibição devido ao uso excessivo de energia das células, no entanto, em baixa intensidade pode afetar o crescimento microalgal devido à falta de energia para realização das necessidades fisiológicas (ASSEMANY et al., 2014).

A vinhaça é composta por 93% de água e 7% de minerais orgânicos e sólidos, o que proporciona alta turbidez e coloração escura (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Tal característica pode ser prejudicial ao desenvolvimento das microalgas, pois prejudicam a entrada da luz no meio de cultivo, causando a limitação da atividade fotossintética, primordial para o crescimento das microalgas (VELOSO et al., 1991).

A fotoinibição é causada pela alta intensidade luminosa, acima do ponto de saturação de luz das microalgas, podendo provocar danos aos receptores de luz e reduzir a taxa de produtividade fotossintética (BOUTERFAS; BELKOURA; DAUTA, 2002; MACEDO; DUARTE; FERREIRA, 2002; TORZILLO et al., 2003; RICHMOND;

CHENG-WU; ZARMI, 2003; RICHMOND, 2004). Em cultivo com alta intensidade luminosa, pode ocorrer o estresse foto-oxidativo, o qual ocorre a redução da clorofila *a* e de outros elementos responsáveis pela captação da luz, além do acúmulo dos carotenoides secundários, conhecidos como fotoprotetores para melhor proteção contra o excesso de luz (HU, 2013).

O autossombreamento também pode ser um problema para absorção da luz pelas microalgas. O aumento da concentração microalgal no meio de cultivo pode reduzir a disponibilidade de luz para cada célula, provocando a redução da atividade fotossintética e consequentemente a redução da produção de biomassa microalgal (SOARES, 2010). A concentração de sólidos suspensos, como matéria orgânica, também pode interferir na luminosidade, pois em alta concentração ocasiona o bloqueio da incidência luminosa, podendo interferir no crescimento das microalgas (ZHU et al., 2013).

No estudo de Marques et al. (2013), as microalgas *Chlorella vulgaris* foram cultivadas em meio com 100%, 50% e 25% de vinhaça tratada anaerobicamente, com fotoperíodo de 12 horas e uma intensidade luminosa de $140 \mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$, e identificaram produtividade de biomassa de 70, 62 e 47 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$, respectivamente. Já no estudo desenvolvido por Santana et al. (2017) realizaram o cultivo de *Micractinium* sp. em meio com vinhaça centrifugada e diluída a 50% com água destilada, com fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de $100 \mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$, e obtiveram uma produtividade de biomassa de $177,78 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$.

Além disso, diversos estudos apontam que a intensidade luminosa está diretamente relacionada com o conteúdo lipídico disponível na célula microalgal (HU, 2013). No estudo realizado por Li e Qin (2005) identificaram que, para a espécie *Botryococcus braunii*, a intensidade luminosa que favorece o acúmulo de lipídios varia de 280 e $466 \mu\text{mol photons m}^2 \text{s}^{-1}$, concluindo como uma faixa luminosa mais favorável para ocorrência da síntese de hidrocarbonetos. De acordo com Assemany et al. (2014), a baixa intensidade luminosa proporciona a falta de energia para realização das necessidades fisiológicas da microalga, o que provoca a redução no acúmulo de lipídios e da produção de biomassa algal.

2.3.3. Temperatura

A temperatura é outro fator que influencia no crescimento das microalgas (RAS; STEYER; BERNARD, 2013), pois a sua variação pode afetar a composição celular, taxa metabólica e conseqüentemente o seu crescimento (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014). A temperatura considerada ideal para as microalgas varia entre 20 e 25 °C, porém no geral, elas são capazes de realizar divisão celular e fotossíntese em uma faixa ampla de temperatura que pode variar de 15 a 30 °C (LI, 1980).

Como é o caso da *Chlorella*, que apresenta ampla faixa de temperatura para crescimento. (RAS; STEYER; BERNARD, 2013). De acordo com Ogbonna et al. (1996), a *Chlorella* normalmente pode ser cultivada em temperatura que varia de 25 a 35 °C, porém apresenta capacidade de desenvolvimento em temperatura até 42°C. O gênero *Spirulina* possui a temperatura considerada ideal para o crescimento de 30 a 40 °C (RICHMOND, 1990), porém microalgas desse gênero são capazes de sobreviver em temperatura que varia de 8 °C até 46 °C (ANDRADE; COSTA, 2007),

No entanto, o crescimento microalgal pode reduzir quando o meio de cultivo sofre uma mudança brusca de temperatura, como uma exposição do cultivo a uma temperatura de 10 °C, quando este está adaptado à alta temperatura (HARRIS, 1978). Por isso, para obtenção de melhores resultados de produtividade microalgal é importante que o cultivo tenha uma constância de temperatura (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014).

O aumento da temperatura causa uma situação parecida com a fotoinibição. Quando a temperatura do meio de cultivo excede o ideal, a taxa de crescimento microalgal diminui devido ao estresse térmico causado, o que prejudica as funções enzimáticas do processo fotossintético, resultando na inibição do crescimento microalgal (RATKOWSKY et al. 1983; SALVUCCI; CRAFTS-BRANDNER, 2004). Além disso, a variação da temperatura do meio de cultivo tem efeitos diretos na composição química das microalgas. O aumento da temperatura causa elevação das proteínas e redução do carboidrato e lipídios, além de causar alterações lipídicas em algumas espécies, reduzindo os ácidos graxos insaturados e elevando os ácidos graxos saturados (MORTENSEN et al., 1988).

Chinnasamy et al. (2009) identificaram que a temperatura de 30 °C para o cultivo de *Chlorella vulgaris* foi ideal para o crescimento das microalgas, obtendo 11 µg mL⁻¹ de clorofila *a* e 210 µg mL⁻¹ de biomassa microalgal. Neste estudo foi relatado

que o crescimento microalgal reduziu de acordo com o aumento da temperatura, além de identificar menor eficiência de captação de nutrientes. Conventi et al. (2009) identificaram que a elevação da temperatura de 25 °C para 30 °C proporcionou em uma redução do conteúdo lipídico da *C. vulgaris*, que variou de 14,71% para 5,90%. Além disso, em cultivo com temperatura a 25 °C, a taxa de crescimento específico era de $\mu=0,14 \text{ d}^{-1}$, o qual sofreu uma redução de 17% quando exposta a 35 °C, e com 38 °C o crescimento foi inibido, sofrendo conseqüentemente a morte. Já no caso da *N. oculata*, foi identificado um aumento no conteúdo lipídico, de 7,90% para 14,92% quando a temperatura do meio variou de 20 °C para 25 °C. Além disso, a taxa de crescimento específico também sofreu uma redução, de $\mu=0,13 \text{ d}^{-1}$ para $\mu=0,07 \text{ d}^{-1}$, identificando que a temperatura ideal para o cultivo é de 20 °C.

As microalgas em fase exponencial tendem a manter o equilíbrio entre o fornecimento da energia fotossintética e o seu consumo dentro da célula, principalmente quando cultivadas em condições ambientais consideradas ideais, em que a célula é capaz de realizar a fotossíntese sem causar alterações em suas funções bioquímica e fisiológica (RAS; STEYER; BERNARD, 2013). No entanto, alterações de temperatura podem causar um desequilíbrio no fornecimento e no consumo de energia, provocando um fator denominado aclimatação fotossintética da temperatura (OQUIST, 1983).

Além disso, a temperatura é um fator que proporciona variações diretas no pH, oxigênio e CO₂ dissolvido e no equilíbrio iônico da água (BOUTERFAS; BELKOURA; DAUTA, 2002). No experimento realizado por Assemany et al. (2014) foram identificadas alterações no pH, onde os maiores valores foram observados nos momentos em que os cultivos apresentavam maior temperatura e incidência de radiação solar.

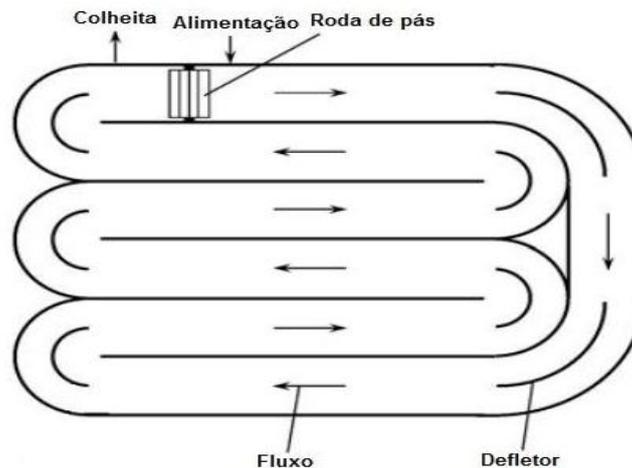
Considerando que os cultivos em larga escala, ao ar livre, vêm aumentando cada vez mais, e que tais cultivos podem sofrer variações de temperatura, a compreensão da influência da temperatura na produtividade microalgal é essencial (RAS; STEYER; BERNARD, 2013). Por isso, o estudo do efeito de cada parâmetro no desenvolvimento das microalgas é importante, pois a partir da compreensão das diferentes condições de cultivo em escala laboratorial é possível otimizar a produção de microalgas em larga escala (ASSEMANY et al., 2014).

2.4. Reatores de cultivo das microalgas

Os sistemas de cultivo de microalgas podem ser divididos em dois grupos: sistema aberto e sistema fechado (SANTOS, 2014). O sistema de cultivo aberto conta com a utilização de luz solar e CO₂, que pode ter origem da própria atmosfera ou ser adicionado (SANTOS, 2014), e são realizados em lagoas ou tanques abertos, que podem apresentar diversos tamanhos e formas.

O sistema aberto mais comum é o sistema *raceway* (FRANCO et al. 2013) ou também chamado de lagoas de alta taxa (*LAT*) (Figura 3). Os sistemas *raceway*'s são constituídos por canais de recirculação independentes que variam de 10 a 50 cm de profundidade, e contam com agitação mecânica de pás no início da lagoa, que tem como objetivo proporcionar uma agitação para não causar o acúmulo de células em áreas com baixo fluxo (MORAES, 2018; SANTOS, 2014). São considerados simples e eficientes, sendo os mais aplicados para cultivo de microalgas em larga escala (BOROWITZKA, 2005). Possuem como vantagem o baixo custo de implantação e operação, além da facilidade na manutenção. No entanto, o clima apresenta uma grande influência na produtividade, podendo interferir na quantidade de iluminação, temperatura, evaporação e CO₂ (SANTOS, 2014). Além disso, conta com o risco de contaminação por espécies indesejadas, que podem provocar competição e reduzir a taxa de crescimento microalgal (FRANCO et al., 2013).

Figura 3 - Sistema de cultivo aberto, tipo *raceway*.

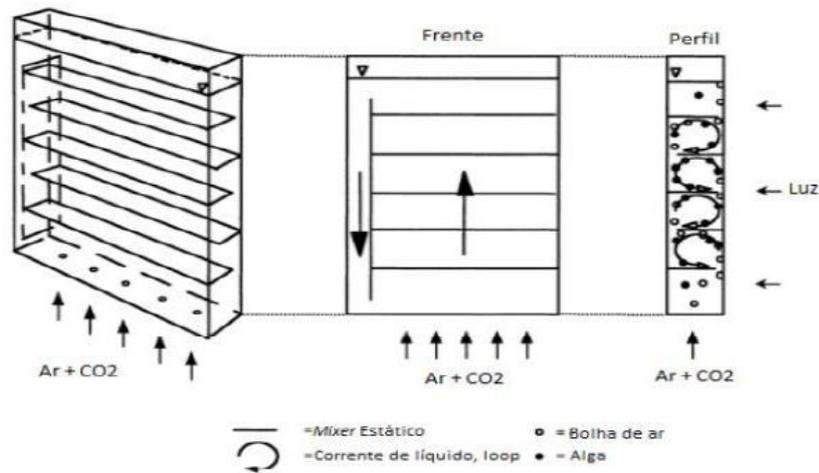


Fonte: CHISTI (2007).

Os sistemas de cultivo fechado são conhecidos como fotobiorreatores, que são utilizados para produção de microalgas em larga escala, tendo o menor contato com o ambiente externo quando comparado com o sistema aberto (FRANCO, et al., 2013). Tem como vantagem o maior controle dos fatores variáveis, como a vazão de ar, CO₂, intensidade luminosa, além de evitar contaminações por microrganismos (SANTOS, 2014).

Existem diversos modelos de fotobiorreatores, no entanto, os modelos mais comumente utilizados são do tipo placas (*flat plate*) (Figura 4), tubulares ou *bubble column* (KOCHEM, 2010). Fotobiorreator de placas ou *flat Plate* tem como vantagem a sua grande superfície para recebimento de iluminação e ocupam pouco espaço para instalação por apresentarem placas finas (KOCHEM, 2010). Além disso, conta com baixo acúmulo de OD, facilidade no escalonamento e pode ser aplicado tanto para sistema *in door* quanto para sistema externo (Xi et al., 2010).

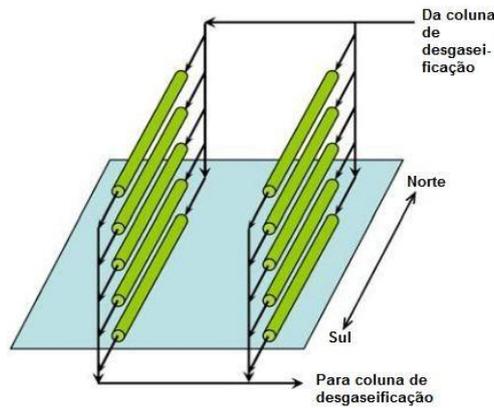
Figura 4 - Fotobiorreator tipo *flat plate*.



Fonte: XI et al. (2010).

Os fotobiorreatores do tipo Tubular (Figura 5) são constituídos por tubos transparentes, que devido a sua forma apresentam maior área para recebimento de iluminação. Nesses sistemas, no geral ocorrem o acúmulo de oxigênio e sobreaquecimento, por isso é comum ser acoplado um desgaseificador com o objetivo o arrefecimento e remover o oxigênio (SANTOS, 2014).

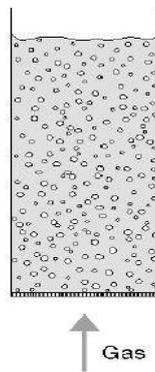
Figura 5 - Fotobiorreator do tipo Tubular.



Fonte: CHISTI (2007).

Já o fotobiorreator do tipo *Bubble Column* (Figura 6) funciona com a aplicação de fluxo de ar, que tem como objetivo homogeneizar o meio através das bolhas que são formadas (SANTOS, 2014). O seu funcionamento é parecido com o modelo *flat plate*, que conta com aproveitamento da incidência luminosa e alta produtividade (GRIMA et al. 1999).

Figura 6 - Fotobiorreator do tipo *bubble column*.



Fonte: GRIMA et al. (1999).

2.5. Cultivo de microalgas em efluentes domésticos e agroindustriais

Os processos convencionais de tratamento de efluentes domésticos apresentam alta eficiência, sendo capazes de liberar os efluentes em conformidade com a legislação (SHEN; GAO; LI, 2017). Entretanto, esses tratamentos apresentam elevado consumo de energia, além de que alguns modelos necessitam de adição de produtos químicos para o

seu funcionamento (ANBALAGAN et al., 2016). Com isso, a busca por tratamentos alternativos de efluentes vem aumentando (SHEN; GAO; LI, 2017), e o interesse pelo cultivo de microalgas em efluentes vem crescendo, pois, as microalgas apresentam capacidade de recuperação de nutrientes, como nitrogênio e fósforo presentes nos efluentes (CHI et al., 2011; SUKACOVA; TRTÍLEK; RATAJ, 2015).

A introdução das microalgas no tratamento de efluentes resulta em uma estação de tratamento de esgoto sustentável, além de reduzir os custos de operação e manutenção, pois os custos de LAT's são mais baixos. Além disso, há também a possibilidade de aproveitamento da biomassa microalgal em diversos setores, como energético e uso como fertilizantes na agricultura.

No estudo desenvolvido por Ruiz-Martinez et al. (2012), o cultivo realizado em escala laboratorial utilizando o efluente doméstico primário derivado do biorreator de membrana anaeróbia submersa (SAnMBR) apresentou uma produtividade de biomassa algal de $234 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, e eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal e de fosfato de 67,2% e 97,8%, respectivamente. Ramsundar et al. (2017) cultivaram *Chlorella sorokiniana* de forma mixotrófica e heterotrófica em efluentes domésticos coletado após tratamento primário e do reator anaeróbio. Com isso, no modo mixotrófico obtiveram uma produtividade de biomassa de $77,14 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, 94,29% de eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal e 83,30% de fosfato. Já no modo heterotrófico a produtividade de biomassa foi de $76,25 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, e eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal e de fosfato foram de 23,53% e 83,81%, respectivamente.

Cho et al. (2011) realizaram cultivos de microalgas *Chlorella* sp. em efluente doméstico coletado após o tratamento secundário e obtiveram a maior taxa de remoção de nitrogênio total (92%) e de fósforo total (86%). Os autores concluíram que, o uso do efluente oriundo do tratamento secundário como meio de cultivo pode ser viável, pois os pré-tratamentos aplicados possibilitam na redução da presença de microrganismos heterotróficos, o que diminui a competição por nutrientes do meio e promove uma maior eficiência de remoção através da assimilação pelas microalgas.

A escolha pelo meio de cultivo se dá pela avaliação quantitativa e qualitativa dos nutrientes presentes no meio, considerados essenciais para o desenvolvimento das microalgas (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014). O uso de efluentes agroindustriais, como os industriais, vinhaça, efluente derivado da produção de azeite de oliva e efluente da suinocultura (JUSIAK et al., 1984; CAZETTA et al., 2005; SÁNCHEZ et al., 2001;

RODRIGUES; BELLI-FILHO, 2004) tem como vantagem a sua produção em larga escala, e geralmente apresentam problemas para descarte devido à presença de elementos tóxicos ou alta carga orgânica, que podem causar poluição ambiental (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014).

No geral, os efluentes agroindustriais apresentam alto teor de nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio, o que possibilita o seu uso como meio de cultivo para as microalgas. Conforme apresentado por Andrade e Colozzi Filho (2014) a Tabela 5 indica o teor desses elementos encontrado em efluente proveniente da suinocultura, laranja e de aterro sanitário.

Tabela 5 - Teor de nitrogênio, fósforo e potássio encontrado em efluente proveniente da suinocultura, laranja e aterro sanitário.

Efluente	N (g L⁻¹)	P (ppm)	K (ppm)
Suíno biodigerido	75,18 - 361,76	2,041 - 1.264,32	306 - 400
Indústria de suco de laranja	37,85	83,27	240
Aterro sanitário	50,4 - 1.412,18	0,012 - 8,2	324 - 1.450

Fonte: ANDRADE; COLOZZI FILHO (2014).

No estudo desenvolvido por Ren et al. (2015) foram realizados cultivos de microalgas da espécie *Scenedesmus* sp. em lodo anaeróbio proveniente das águas residuais da fabricação de amido, juntamente com as bactérias presentes no próprio lodo. Como resultado obtiveram eficiência de remoção de 80,5% para a DQO, 88,7% para o nitrogênio e 80,1% para o fósforo. Ding et al. (2016) utilizaram microalgas *Chlamydomonas* sp. para o cultivo em efluente derivado da indústria de óleo de palmas e identificaram μ máx = 0,715 d⁻¹, 1,047 d⁻¹ e 1,335 d⁻¹ em efluentes com diluições de 25%, 16,7% e 12,5% respectivamente. Além disso foram observadas eficiências de remoções máximas de 29,13% de DQO, 72,97% de nitrogênio total, 100% de nitrogênio amoniacal e 63,53% de fósforo total.

Ji et al. (2012) cultivaram *Chlorella vulgaris* em efluente residuais de porcos e verificaram uma eficiência de remoção máxima de nitrogênio amoniacal de 68%, 41% de fósforo total e 42% de DQO. Já Mata et al., (2012) cultivaram *Scenedesmus obliquus* em efluente da indústria de cerveja, e identificaram uma redução de 57,5% de DQO,

20,8% de nitrogênio total e 56,9% de carbono total, além de obterem 0,9g L⁻¹ de biomassa algal seca.

Travieso et al. (2008) relataram a eficácia no tratamento do efluente derivado de destilaria utilizando microalgas *C. vulgaris*, os quais apresentaram 98% de remoção de DQO e DBO, permitindo que o efluente seja descartado conforme a legislação. Com isso, pode ser confirmado a eficiência de remoção de nutrientes presentes nos efluentes agroindustriais através do cultivo de microalgas, além da obtenção de biomassa microalgal.

2.6. Cultivo de microalgas em vinhaça

A vinhaça, um subproduto gerado na destilação do etanol é caracterizado como efluente que apresenta potencial de poluição cerca de 100X maior comparado ao esgoto doméstico, devido principalmente à elevada concentração de matéria orgânica. É um efluente que apresenta alta temperatura quando sai dos destiladores, além de alta corrosividade, concentração de DQO (Demanda Química de Oxigênio) e DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), e uma coloração marrom clara, que tende a escurecer com a fermentação (FREIRE; CORTEZ, 2000). No entanto, conta com micro e macronutrientes essenciais para o desenvolvimento de microalgas, sendo uma alternativa para cultivo de microalgas que visa minimizar as contaminações ambientais causadas pelo seu descarte tanto nos solos, quanto nos corpos d'águas (MONÇÃO et al., 2018).

Apesar das suas características citadas, a vinhaça pode apresentar uma produção de biomassa algal significativa quando utilizada de forma favorável às microalgas (CALIXTO et al., 2016). A correção do pH e diluição podem ser alternativas aplicadas para o cultivo das microalgas. Embora a taxa de diluição ideal ainda seja pouco conhecida, a concentração de sólidos suspensos e a turbidez podem ser reduzidas, favorecendo na passagem de luz para realização da fotossíntese. Entretanto, a concentração de nutrientes presentes na vinhaça também é reduzida com a diluição, o que pode ser prejudicial para o desenvolvimento das microalgas (SYDNEY et al., 2019), e por isso, a avaliação da diluição adequada para o cultivo é essencial para obter maior produtividade de microalgas.

Considerando uma produção de larga escala, o uso de água potável como um diluente pode ser um limitador, visto que é um recurso escasso e o seu uso deve ser

preservado para outros fins. A diluição da vinhaça possibilita na melhor condição para cultivo das microalgas, entretanto, esta deve ser feita a partir de recursos mais abundantes, evitando o uso de água pura para tal prática. Pensando nisso, o uso de esgoto doméstico pré-tratado pode ser uma alternativa, pois além de apresentar nutrientes importantes para o desenvolvimento microalgal em sua composição, o seu uso pode reduzir os impactos ambientais causados pelo lançamento em corpos d'águas. A adição da vinhaça em esgoto doméstico pré-tratado pode possibilitar no melhor desenvolvimento microalgal, pois a relação C/N da vinhaça é mais elevada comparada a do esgoto doméstico, o que reduz a necessidade de adição de CO₂ no meio.

Além da diluição, o uso da vinhaça pré-tratada também pode ser considerado como alternativa, visto que com o tratamento, a carga orgânica da vinhaça pode ser reduzida, havendo possibilidade de uso como meio de cultivo sem a necessidade de diluição. Existe ainda a possibilidade de uso da vinhaça como um meio de suplementação de nutrientes, que pode ser acrescido ao efluente doméstico utilizado como meio de cultivo de microalgas.

Ruas et al. (2018) por exemplo, avaliaram o cultivo associado de microalgas e bactérias em biorreator de 11,8L, com 20% de concentração de vinhaça, o qual foi diluída em água destilada. Com isso, os autores obtiveram produtividade microalgal de 4,1 mg L⁻¹ d⁻¹ e eficiência de remoção de DQO, NTK e P total de 74,3%, 95,4% e 72,8%, respectivamente. Entretanto, ao final do experimento os autores verificaram que, a vinhaça tratada através do cultivo de microalgas pode ser utilizada como um diluente de vinhaça para os próximos cultivos. Assim, o processo torna-se economicamente e ambientalmente mais viável, considerando que a diluição da vinhaça não necessitaria de água, e o efluente tratado apresentaria padrões de lançamento adequado.

Quanto à produtividade microalgal e eficiência de remoção de nutrientes, verifica-se estudos realizados com diversas diluições de vinhaça. Marques et al. (2013), por exemplo, realizaram o cultivo de *Chlorella vulgaris* utilizando biorreatores de 600 mL, com 25%, 50% e 100% de concentração de vinhaça pré-tratada anaerobicamente, as quais foram diluídas em efluente doméstico tratado. Assim, a produtividade microalgal observada foi de 47, 62 e 70 mg L⁻¹ d⁻¹ nos cultivos com 100%, 50% e 25% vinhaça, respectivamente. Além disso, o cultivo com 100% apresentou 100% de eficiência de remoção de NH₄, NO₃ e PO₄.

Neste mesmo estudo, também foram realizados cultivos em 25%, 50% e 100% de concentração de vinhaça *in natura*, as quais foram diluídas através de efluente doméstico tratado para padronização da DQO do meio em 2 g L⁻¹. Os cultivos com 50% e 100% não apresentaram crescimento celular, no entanto, foi verificada uma taxa de crescimento de $\mu=0,1d^{-1}$ no cultivo com 25%, o que corresponde a uma concentração final de vinhaça de 2%. Nesta diluição também foi verificado 100% de eficiência de remoção de NO₃ e PO₄ e 75% de remoção de DQO. Os autores relataram a possibilidade da alta toxicidade da vinhaça utilizada para o cultivo, quando aplicada em concentrações acima de 4% e confirmaram a possibilidade de uso da vinhaça pré-tratada anaerobicamente, e diluída através de efluente doméstico para o cultivo de microalgas.

No estudo desenvolvido por Quintero-Dallos et al. (2019), *Chlorella vulgaris* foram cultivadas em reatores tubulares de 5 L, com temperatura 25 °C, e em meios com 10%, 25% e 75% de vinhaça *in natura*, que foram diluídas com água. A maior produtividade microalgal foi observada em cultivo com 75%, apresentando 240 mg L⁻¹ d⁻¹ e 5,11 g L⁻¹ de concentração de biomassa ao final dos 18 dias de cultivo. Os autores relatam a relação do crescimento microalgal com a maior concentração de nutrientes oriundos da vinhaça no meio de cultivo. Já os meios com 10% e 25% apresentaram 50 mg L⁻¹ d⁻¹ e 150 mg L⁻¹ d⁻¹ de produtividade microalgal. Apesar da baixa produtividade microalgal do meio com 10%, foi relatada uma eficiência de remoção de 85% para carbono orgânico total, e com isso, os autores afirmaram que a vinhaça pode ser um meio eficaz para o crescimento microalgal.

Já Trevisan et al. (2020) realizaram cultivo de *Chlorella vulgaris* em Erlenmeyers de 2 L, utilizando diferentes diluição de vinhaça biodigerida (10, 20, 30, 40 e 50%). Os cultivos ocorreram sob 5.000 lux de iluminação com fotoperíodo de 24h, temperatura 25 °C, durante 16 dias. A concentração máxima de biomassa seca foi identificada no 10 dia, no cultivo que apresentava 50% de diluição (300 mg L⁻¹). Este resultado pode ser explicado provavelmente devido a maior concentração de nutrientes. Ao final de 16 dias de cultivo, os cultivos com 40% e 50% de diluição apresentavam maiores concentrações de biomassa (197,5 mg L⁻¹ e 200,9 mg L⁻¹), quando comparado aos cultivos que apresentavam somente 20% (160,9 mg L⁻¹) e 30% (149,8 mg L⁻¹) de diluição da vinhaça. Tais resultados podem ser explicados pela alta concentração de N-NH₄⁺ do meio, que contribuiu para o crescimento das microalgas. Maior concentração de chl *a* foi verificada no cultivo com 40% de diluição da vinhaça (3,05 mg L⁻¹), além

de apresentar variações na coloração durante o cultivo, sendo que a coloração escura da vinhaça variou menos em baixas diluições. A menor diluição se mostrou menos eficiente para o tratamento, o que pode estar associado a menor concentração de N-NH₄⁺ e com isso, os autores afirmaram que a concentração da vinhaça pode afetar a composição da biomassa microalgal e seus pigmentos, alterando também a coloração da vinhaça em até 70% a partir da remoção de nutrientes.

3. CONCLUSÃO

Conforme apresentado neste trabalho, o Brasil é um dos maiores produtores de etanol a partir da cana-de-açúcar, o que gera conseqüentemente grande quantidade de vinhaça como seu principal resíduo. Embora a vinhaça seja utilizada para fertirrigação de lavouras de cana-de-açúcar, o seu grande volume e suas características bioquímicas apresentam elevado riscos de poluição ambiental, podendo causar contaminação do solo, das águas superficiais e subterrâneas. Com isso, o seu tratamento torna-se primordial antes do descarte, e diversos estudos são desenvolvidos em busca do melhor tratamento. Assim, o cultivo de microalgas vem se destacando como uma das alternativas promissoras.

As microalgas apresentam capacidade de assimilação de nutrientes como nitrogênio, fósforo, potássio, entre outros macros e micronutrientes presentes na vinhaça, possibilitando o tratamento do efluente. Entretanto, a vinhaça apresenta alta concentração de sólidos suspensos e turbidez, o que promove uma coloração escura e dificulta na passagem de luz e realização de fotossínteses, atividade essencial para o crescimento das microalgas.

Além disso, a vinhaça conta com presença de microrganismos heterotróficos e apresenta características físicas e químicas com elevado potencial poluidor ao meio ambiente. Por isso, a diluição e correção do pH antes de iniciar o cultivo das microalgas é essencial para elevar a produtividade microalgal. No entanto, a diluição utilizando água pode ser inviável quando consideramos um cultivo em larga escala, pois a água é um recurso natural escasso e economicamente inviável.

Considerando que as microalgas atuam como um biorremediador, a sua aplicação pode ser viável como um processo terciário de tratamento de efluentes. Além disso, o tratamento da vinhaça a partir de microalgas pode ter como resultado um efluente tratado, que atende os padrões de lançamento de efluente em corpos d'águas, sendo possível a sua aplicação para diluição de outras vinhaças a serem utilizadas para cultivos de microalgas subsequentes.

Assim, é importante verificar a concentração de vinhaça considerada ideal para o desenvolvimento microalgal, visando a recuperação de nutrientes e aplicação de um tratamento de vinhaça considerado simples e de baixo custo.

REFERÊNCIAS

- ABURAI, N. et al. Composition of carotenoids and identification of aerial microalgae isolated from the surface of rocks in mountainous districts of Japan. **Algal Research**, v.2, p.237–243, 2013. DOI:10.1016/j.algal.2013.03.001.
- ANBALAGAN, A. et al. Influence of hydraulic retention time on indigenous microalgae and activated sludge process. **Water Research**, v.91, p.277–284, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.01.027>.
- ANDERSEN, R.A. **The Microalgal Cell**. In: RICHMOND, A.; HU, Q. Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. Editora **Wiley-Blackwell**, 2 ed., p.3-20, 2013.
- ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. **Microalgas de águas continentais: Potencialidades e desafios do cultivo**. Londrina: Editora IAPAR, v.1, 343 p., 2014.
- ANDRADE, L. M. de. **Produção de microalgas e caracterização de sua composição protéica e lipídica via espectrometria de massas**. 2014. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2014.
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J.A.V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v.264, p.130-134, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.021>.
- AQUINO, S. F. de; SILVA, S. de Q; CHERNICHARO, C. A. L. Considerações práticas sobre o teste de demanda química de oxigênio (DQO) aplicado a análise de efluentes anaeróbios. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v.11, p.295-304, 2006. <https://doi.org/10.1590/S1413-41522006000400001>.
- ARANA, I., ORRUÑU, M., BARCINA, I. **How to Solve Practical Aspects of Microbiology 4: Determination of the parameters defining the bacterial growth**. Espanha, 2013. Disponível em: https://ocw.ehu.es/file.php/253/Temas/2_BASIC_METHODS_FOR_THE_ENUMERATION_OF_MICROORGANISMS.pdf. Acesso em: 4 jul. 2020.
- ARANTES, R. B. S. **Sorção de Fósforo de Efluente Doméstico Tratado em Lodo de ETA e Aplicação do Resíduo em Solo Cultivado com Milho**. 2019. 86 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos em Sistemas Agrícolas) - Universidade Federal de Lavras, 2019.
- ARAUJO, G. J. F.; OLIVEIRA, S. V. W. B. Vinhaça - Conceitos, desafios e oportunidades: Uma revisão Bibliográfica. In: **XXIII SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO: GESTÃO DE OPERAÇÕES EM SERVIÇOS E SEUS IMPACTOS SOCIAIS**, 2016, Bauru, SP.
- ARBIB, Z. et al. Long term outdoor operation of a tubular airlift pilot photobioreactor and a high rate algal pond as tertiary treatment of urban wastewater. **Ecological Engineering**, v.52, p.143–153, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.12.089>.

- ASLAN, S; KAPDAN, I. K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological Engineering**, v.28, p.64-70, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2006.04.003>.
- ASSEMANY, P. P. et al. Effect of solar radiation on the lipid characterization of biomass cultivated in highrate algal ponds using domestic sewage. **Environmental Technology**, v.35, p.2296-2305, 2014. <https://doi.org/10.1080/09593330.2014.902111>.
- AZEVEDO, S. M. F. O.; VASCONCELOS, V. Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública. **Medicina on line**, v.3, n.1, p.1-19, 1998.
- AZOV, Y; GOLDMAN, J. C. Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, p.735–739, 1982.
- BARSANTI, L. et al. Oddities and Curiosities in the Algal World. *In*: EVANGELISTA V., BARSANTI L., FRASSANITO A.M., PASSARELLI V., GUALTIERI P. Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection. **NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology**. Dordrecht: Ed. Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8480-5_17.
- BATISTA, A. P. et al. Microalgae biomass: a potential ingredient for the food industry. *In*: **EFFoST/EHED Joint Conference**, 2007, Lisboa, Portugal.
- BATTISTI, A. C. et al. Leachate and vinasse used in a biological process combined with fenton's reaction: A green method for treatment of textile effluents. **An. Acad. Bras. Cienc.** v.91, n.04, 2019. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920181156>.
- BECHTOLD, T.; MUSSAK, R. Chlorophylls. *In*: **Handbook of natural colorants**. New Jersey, EUA. Editora John Wiley and Sons, v.8, p.243-254, 2009.
- BECKER, E,W, **Microalgae for human and animal nutrition**. *In*: RICHMOND A, HU Q, Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. Editora John Wiley and Sons, 2 ed., p.461–503, 2013. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch25>.
- BELAY, A. **Biology and Industrial Production of *Arthrospira (Spirulina)***. *In*: RICHMOND, A.; HU, Q. Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. Editora John Wiley and Sons, 2 ed., p.339-358, 2013.
- BENEMANN, J. R. Open Ponds and Closed Photobioreactors: Comparative Economics. **5th Annual World Congress on Industrial Biotechnology and Bioprocessing**, v.30, Chicago, 2008.
- BERENGUEL, M. et al. Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. **Jornal of Process Control**, v.14, p.377-387, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jprocont.2003.07.001>.

BERTOLD, F., SANT'ANNA, E., OLIVEIRA, J. Revisão: Biotecnologia de Microalgas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.26, n.1, p.9-20, 2008.

BETTIN, F. **Treating urban wastewaters with microalgae : batch and continuous flow experiments and preliminary process design**. 2014. Tese (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Departamento de Engenharia Civil, Construção e Meio Ambiente, Universidade de Pádua, Itália, 2014.

BICUDO, C. E. D. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições**. Editora Rima, 2 ed. São Carlos, SP, 502p., 2006.

BOBBIO, F. O; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1995.

BORDONAL, R. D. O. et al. Sustainability of sugarcane production in Brazil: a review. **Agron. Sustain**, v.38, n.2, p.1–23, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0490-x>.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v.70, p.313–321, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00083-8).

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. **Journal of Biotechnology**, 1999, v.70, p.313–321. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00083-8).

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**. Editora Edgar Blücher, 1ª ed, v.4, São Paulo, 2001.

BOUTERFAS, R; BELKOURA, M; DAUTA, A. Light and temperature effects on the growth rate of three freshwater algae isolated from a eutrophic lake. **Hydrobiologia**, v.489, 207–217, 2002. <https://doi.org/10.1023/A:1023241006464>.

BROWN, L. M. et al. Computer-based image analysis for the automated counting and morphological description of microalgae in culture. **Journal of Applied Phycology**, v.1, p.211–225, 1989.

BROWN, M. R. et al. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v.151, p.315-331, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01501-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01501-3).

BRUTON T. A review of the potential of marine algae as a source of biofuel in Ireland. **Sustainable Energy Ireland**, p.1-88, 2009.

CAI, T.; PARK, S. Y.; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.19, p.360-369, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.030>.

CALIXTO, C. D. et al. Biochemical compositions and fatty acid profiles in four species of microalgae cultivated on household sewage and agro-industrial residues. **Bioresour. Technol.**, v.221, p.438–446, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.066>.

CANDIDO, C. **Cultivo de *Chlorella vulgaris* em vinhaça convencional e biodigerida tratadas: uma abordagem ecofisiológica**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

CANDIDO, C.; LOMBARDI, A. T.; LIMA, M. I. S. Cultivo de *Chlorella Vulgaris* em vinhaça filtrada. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, ISSN 2176-9478, n.35, p.55-62, 2015. Disponível em: http://www.rbciamb.com.br/index.php/Publicacoes_RBCIAMB/article/view/206. Acesso em: 20 jul. 2020.

CAVALETT, O. et al. Environmental and economic assessment of sugarcane first generation biorefineries in Brazil. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v.14, n.3, p.399–410, 2011. doi:10.1007/s10098-011-0424-7.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C. Aproveitamento do melão e vinhaço de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa proteica e lipídica por leveduras e bactéria. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.26, p.105-112, 2005.

CELEKLI, A; YAVUZATATMACA, M. Predictive modeling of biomass by *Spirulina platensis* as function of nitrate and NaCl concentrations. **Bioresource Technology**, v.100, p.1847–1851, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.042>.

CETESB. Relatório de Qualidade das Águas Superficiais - Apêndice D - Significado Ambiental e Sanitário das Variáveis de Qualidade. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-content/uploads/sites/12/2013/11/Ap%C3%AAndice-D-Significado-Ambiental-e-Sanit%C3%A1rio-das-Vari%C3%A1veis-de-Qualidade-29-04-2014.pdf>. Acesso em: 22 jul. 2020.

CHAO, I. R.S. **Remoção de fósforo de efluentes de estações de tratamento biológico de esgoto utilizando lodo de estação de tratamento de água**. 2006. 160p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CHEAH, W. Y. et al. Cultivation in wastewaters for energy: A microalgae platform. **Applied Energy**, v.179, p.609–625, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.07.015>.

CHEN, H; JIANG, G. Lipid Accumulation Mechanisms in Auto- and Heterotrophic Microalgae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.65, p.8099-8110, 2017. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b03495.

CHEW, K.W. et al. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. **Bioresource Technology**, v. 229, p.53–62, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.006>.

CHI, Z. et al. Lipid production by culturing oleaginous yeast and algae with food waste and municipal wastewater in an integrated process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.165, p.442-453, 2011. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9263-6>.

CHIES, V. Microalgas para produção de biocombustíveis serão apresentadas na Agrishow. **Embrapa**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2749249/microalgas-para--producao-de-biocombustiveis-serao-apresentadas-na-agrishow>. Acesso em: 2 jul. 2020.

CHINNASAMY, S. et al. Biomass Production Potential of a Wastewater Alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under Elevated Levels of CO₂ and Temperature. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, p.518–532, 2009. <https://doi.org/10.3390/ijms10020518>.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v.25, p.294–306, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>.

CHO, S. et al. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. **Bioresource Technology**, v.102, p.8639–8645, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.037>.

CHOCHOIS, V. et al. Hydrogen production in *chlamydomonas*: photosystem II-dependent and -independent pathways differ in their requirement for starch metabolism. **Plant Physiology**, v.151, p.631–640, 2009. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144576>.

CHOJNACKA, K; MARQUEZ-ROCHA, F. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v.3, p.21–34, 2004.

CHRISTOFOLETTI, C. A. et al. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v.33, n.12, p.2752–2761, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2013.09.005>.

Como é realizado a contagem de células? **KASVI**. Disponível em: <https://kasvi.com.br/como-e-realizada-contagem-de-celulas/>. Acesso em: 28 jun. 2020.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Boletim da safra de cana-de-açúcar. **4º Levantamento - Safra 2019/20 2020**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. Acesso em: 26 ag. 2021.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Receita Bruta dos Produtores Brasileiros. Safra 2016-2017 2020**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/precos/receita-bruta-dos-produtos-brasileiros>. Acesso em: 26 ag. 2021.

CONVERTI, A. et al. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel

production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v.48, p.1146–1151, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2009.03.006>.

CORNET, J. F.; DUSSAP, C. G.; GROS, J. B. Kinetics and energetics of photosynthetic microorganisms in photobioreactors. Application to Spirulina growth. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.59, p.155-223, 1998.

CORRELL, D. L. Phosphorus: A rate limiting nutrient in surface waters. **Poultry Science**, v.78, p.674-682, 1999.

COUNCIL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. N° L135/40 – 52, **Council directive of 21 mai 1991**. Concerning urban waste water treatment (91/271/EEC). Disponível em: http://www.hwa.uk.com/site/wp-content/uploads/2018/11/LEG_5-Council-Directive-91-271-EEC-of-21-May-1991-concerning-urban-waste-water-treatment.pdf. Acesso em: 15 ag. 2020.

CRAGGS, R. J. Advanced integrated wastewater ponds. *In*: SHILTON, A. Pond Treatment Technology, London, UK, p.282–310, 2005.

CRAGGS, R; SUTHERLAND, D; CAMPBELL, H. Hectare-scale demonstration of high rate algal ponds for enhanced wastewater treatment and biofuel production. **Journal of Applied Phycology**, v.24, p.329–337, 2012.

CUHEL, R. L; LEAN, D. R. S. Influence of light intensity, light quality, temperature and day length on uptake and assimilation of carbon dioxide and sulphate by lake plankton. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.44, p.2118–2132, 1987. <https://doi.org/10.1139/f87-261>.

DA SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v.11, p.108–14, 2007. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662007000100014>.

DAILEY, H.A. **Biosynthesis of heme and chlorophylls**. Editora John Wiley and Sons, Nova Iorque, 1990.

DARVEHEI, P; BAHRI, P; MOHEIMANI, N. Model development for the growth of microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.97, p.233-258, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.08.027>.

DE GODOI, L. A. G. et al. Seasonal variation of the organic and inorganic composition of sugarcane vinasse: main implications for its environmental uses. **Environmental Science Pollution Research**, v.26, n.28, p.29267–29282, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06019-8>.

DE MELO, R.G. et al. *Chlorella vulgaris* mixotrophic growth enhanced biomass productivity and reduced toxicity from agro-industrial by-products. **Chemosphere**, v.204, p.344-350, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.039>.

DECOSTERE, B. et al. Validation of a microalgal growth model accounting with inorganic carbon and nutrient kinetics for wastewater treatment. **Chemical Engineering Journal**, v.285, p.189–197, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.09.111>.

DEL NERY, V. et al. Hydraulic and organic rates applied to pilot scale UASB reactor for sugar cane vinasse degradation and biogas generation. **Biomass and Bioenergy**, v.119, p.411–417, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.10.002>.

Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG N.º 1, de 05 de Maio de 2008. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/processos/EFABF603/DeliberaNormativaConjuntaCOPAM-CERHno01-2008.pdf>. Acesso em: 7 de jul. 2020.

DERNER, R.B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poli-insaturados**. 2006. 158p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

DING, G.T. et al. Biomass production and nutrients removal by a newly-isolated microalgal strain *Chlamydomonas* sp. in palm oil mill effluent (POME). **International Journal of Hydrogen Energy**, v.41, p.4888–4895, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.12.010>.

DUBINSKY, Z. Productivity of algae under natural conditions: algal mass culture and water blooms in nature. In: RICHMOND, A. **CRC Handbook of microalgal mass culture**. 1ª ed., p.101-116, Boca Raton, 1990.

DULEKGURGEN, E. et al. Size distribution of wastewater COD fractions as an index for biodegradability. **Water Research**, v.40, n.2, p.273-282, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.10.032>.

ELICKER, C. et al. Estudo da utilização da biomassa de cianobactérias como matéria-prima para a síntese de biodiesel através da reação de esterificação *in situ*. **Revista Virtual de Química**, v.7, n.6, p.2497-2508, 2015. DOI: 10.5935/1984-6835.20150149.

ENGIN, I.K. et al. Evaluation of heterotrophic and mixotrophic cultivation of novel *Micractinium* sp. ME05 on vinasse and its scale up for biodiesel production. **Bioresour. Technol**, v.251, p.128–134, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.023>.

FAQUIN, V. Nutrição mineral de plantas. Lavras: Ed. UFLA/FAEPE, 2005.

FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3ª ed, Editora Marcel Dekker, New York, 1996.

FINKEL, Z.V. et al. Phylogenetic Diversity in the Macromolecular Composition of Microalgae. **PLOS ONE**, v.11, n.5, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155977>.

FORTI, J.C., et al. Redução de nutrientes da vinhaça por microalgas *Chlorella vulgaris*. **Research, Society and Development**, v.9, n.10, 2020. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i10.8763>.

FRANCO, A. L. C. et al. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v.36, p.437-448, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000300015>.

FREIRE, W. J.; CORTEZ, L. A. B. Vinhaça de cana-de-açúcar. **Agropecuária**, Guaíba, 2000.

FU, C. C. et al. Hydrolysis of microalgae cell walls for production of reducing sugar and lipid extraction. **Bioresource Technology**, v.101, p.8750–8754, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.100>.

GAIVÃO, J. J. R. P. M. **Aplicação de diferentes metodologias na produção de biodiesel a partir da microalga *Nannochloropsis* sp.** 2013. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia da Energia e do Ambiente) - Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013.

GARCÍA, J; MUJERIEGO, R; HERNANDEZ-MARINE, M. High rate algal pond operating strategies for urban wastewater nitrogen removal. **Journal of Applied Phycology**, v.12, p.331–339, 2000. <https://doi.org/10.1023/A:1008146421368>.

GEIDER, R.J; LAROCHE, J. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. **European Journal of Phycology**, v.37, p.1–17, 2002. <https://doi.org/10.1017/S0967026201003456>.

GIORDANI, D. **Análise de Técnicas para Contagem de Microalgas baseadas na Análise de Imagens.** Trabalho de diplomação (Graduação em Engenharia Química) - Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

GOES, T.; MARRA, R.; SOUZA, G. da S. Setor sucroalcooleiro no Brasil: situação atual e perspectivas. **Revista de Política Agrícola**, n.2, p.39-51, 2008.

GOLDMAN, J. C. **Physiological aspects in algal mass cultures.** In: SHELEF G; SOEDER, C. J. *Algal Biomass*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York, p.343–353. 1980.

GOUVEIA, L. et al. **Microalgae in novel food product.** In: *Food chemistry research developments*. New York, Nova Science Publishers, p.1–37, 2008.

GREEN, M. B.; FINLAY, J. C. Patterns of hydrologic control over stream water total nitrogen to total phosphorus ratios. **Biogeochemistry**, v.99, p.15-30, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10533-009-9394-9>.

GRIMA, E.M. et al. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. **Journal of Biotechnology**, v.70, p.231-247, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(99\)80118-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(99)80118-0).

- GROBBELAAR, J. U. **Inorganic Algal Nutrition**. In: RICHMOND, A.; HU, Q. Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. Editora John Wiley and Sons, 2 ed., p.123-133, 2013.
- GROSS, J. **Pigments in vegetables, chlorophylls and carotenoids**. Editora Van Nostrand Reinhold, New York, 1991.
- HARRIS, G. P. Photosynthesis, productivity and growth: the physiological ecology of phytoplankton. **Ergebnisse der limnologie**, v.10, p.1–171, 1978.
- HAVLIK, I. et al. On-line monitoring of large cultivations of microalgae and cyanobacteria. **Trends in Biotechnology**, v.31, n.7, p.406–414, 2013. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.04.005.
- HENDRY, G.A.F.; HOUGHTON, J.D. **Natural food colorants**. Editora Black Academic Professional, London:, 1996.
- HENZE, M. Characterization of wastewater for modeling of activated-sludge processes. **Water Science Technology**, v.25, n.6, p.1-15, 1992. <https://doi.org/10.2166/wst.1992.0110>.
- HENZE, M. et al. A general model for single-sludge wastewater treatment systems. **Water Research**, v.21, n.5, p.505-515, 1987.
- HEUBECK, S; CRAGGS, R.J. Resource assessment of algae biomass for potential bio-energy production in New Zealand. **NIWA**, 2007.
- HEUBECK, S; CRAGGS, R. J; SHILTON, A. Influence of CO₂ scrubbing from biogas on the treatment performance of a high rate algal pond. **Water Science and Technology**, v.55, p.193–200, 2007. <https://doi.org/10.2166/wst.2007.358>.
- HOARAU, J. et al. Sugarcane vinasse processing: Toward a status shift from waste to valuable resource. A review. **Journal of Water Process Engineering**, v.24, p.11–25, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.05.003>.
- HOH, D; WATSON, S; KAN, E. Algal biofilm reactors for integrated wastewater treatment and biofuel production: a review. **Chemical Engineering Journal**, v.287, p.466–473, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.11.062>.
- HU Q. et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **Plant Journal**, v.54, p.621–63, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>.
- HU, Q. **Environmental Effects on Cell Composition**. In: RICHMOND, A.; HU, Q. Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. Editora John Wiley and Sons, 2 ed., p.114-122, 2013.

HU, Q. **Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products - major industrial species: *Arthrospira (Spirulina) platensis***. In: RICHMOND, A.; HU, Q. Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. Editora John Wiley and Sons, 2 ed., p.264-272, 2004.

HU, Z. et al. Evaluation a rapid physicalchemical method for the determination extant soluble COD. **Water Research**. v. 36, n. 3, p. 617-624, 2002.
[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00273-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00273-1).

HUANG, G. et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v.87, p.38-46, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.06.016>.

JACKSON, G. S. et al. A computerized plankton counter. **Hydrobiologia**, v.118, p.225–228, 1984.

JI, M. K. et al. Simultaneous nutrient removal and lipid production from pretreated piggery wastewater by *Chlorella vulgaris* YSW-04. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, p.2701–2710, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4097-x>.

JIA, H.; YUAN, Q. Removal of nitrogen from wastewater using microalgae and microalgae-bacteria consortia. **Cogent Environmental Science**, v.2, n.1, 2016.
<https://doi.org/10.1080/23311843.2016.1275089>.

JOHNSON, I. et al. Chapter 10 - Cyanobacteria/microalgae for distillery wastewater treatment-past, present and the future. **Microbial Wastewater Treatment**, p. 195–236, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816809-7.00010-5>.

JUSIAK, M. P. et al. Intensive culture of *Chlorella vulgaris*/AA as the second stage of biological purification of nitrogen industry wastewater. **Water Research**, v.18, p.1-7, 1984. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(84\)90040-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(84)90040-X).

KAPLAN, D. et al. **Algal nutrition**. In: RICHMOND, A.; HU, Q. Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. Editora John Wiley and Sons, 2 ed., p. 147–198, 1986.

KIM, J. et al. Removal of ammonia from wastewater effluent by *Chlorella vulgaris*. **Tsinghua Science and Technology**, v.15, p.391–396, 2010. doi: 10.1016/S1007-0214(10)70078-X.

KOCHEM, L.H. **Caracterização de fotobioreator air-lift para cultivo de microalgas**. Trabalho de diplomação (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

KOYANDE, A. K. et al. Bio-processing of algal bio-refinery: a review on current advances and future perspectives. **Bioengineered**, v.10, p.574–592, 2019.
<https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1679697>.

KWIETNIEWSKA, E. et al. Microalgae: cultivation and application of biomass as a source of energy: a review. **Instytut Agrofizyki**, n.2, p.1-108, 2012.

- LEE, D. H. Algal biodiesel economy and competition among bio-fuels. **Bioresource Technology**, v.102, p. 43-49, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.034>.
- LEE, E; ZHANG, Q. Integrated co-limitation kinetic model for microalgae growth in anaerobically digested municipal sludge centrate. **Algal Research**, v,18, p.15–24, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.05.019>.
- LEE, YUAN-KUN et al. **Basic Culturing and Analytical Measurement Techniques**. In: RICHMOND, A.; HU, Q. Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. Editora John Wiley and Sons, 2 ed., p.37-68, 2013.
- LI, W. K. W. **Temperature adaptation in phytoplankton: cellular and photosynthetic characteristics**. In: FALKOWSKI P.G. Primary productivity in the sea. Editora Springer, New York, p.259–279, 1980.
- LI, Y. et al. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.81, p.629–636, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1681-1>.
- LI, Y; QIN, J.G. Comparison of growth and lipid content in three *Botryococcus braunii* strains. **Journal of Applied Phycology**, v.17, p.551–556, 2005. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-9005-7>.
- LIANG, Y; SARKANY, N; CUI, Y. Biomass and lipid productivities os *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth condicions. **Biotechnololy Letters**, v.31, p.1043-1049, 2009. DOI 10.1007/s10529-009-9975-7.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. Editora Rima, São Carlos, SP, 588p., 2006.
- LYRA, M. R. C. C.; ROLIM, M. M.; SILVA, J. A. A da. Toposseqüência de solos fertigados com vinhaça: contribuição para a qualidade das águas do lençol freático. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental**, v.7, n.3, p.525-531, 2003. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662003000300020>.
- MACEDO, R. V. T. de; ALEGRE, R. M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *spirulina maxima* em dois níveis de temperatura: Parte II - Produção de lipídios. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.2, p.183–186, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612001000200011>.
- MACEDO, M.F; DUARTE, P; FERREIRA, J. The influence of incubation periods on photosynthesis–irradiance curves. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.274, p.101–120, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(02\)00202-2](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(02)00202-2).
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Departamento de Recursos Hídricos e Saneamento, Núcleo de Engenharia Ambiental e Sanitária. **Manual de Análises Laboratoriais.**, UFLA, 2019.

- MARONEZE, M. M. et al. A tecnologia de remoção de fósforo: gerenciamento do elemento em resíduos industriais. **Revista Ambiente & Água**, v.9, n.3, 2014. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.1403>.
- MARQUES, S. S. I. et al. Growth of *Chlorella vulgaris* on Sugarcane Vinasse: The Effect of Anaerobic Digestion Pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.171, n.8, p.1933–1943, 2013. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0481-y>.
- MATA, T. M. et al. Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v.107, p.151–158, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.109>.
- MATA, T; MARTINS, A; CAETANO, N. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.217-232, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>.
- MIKI, W. Biological function and activities of animal carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v.63, n.1, p.141-146, 1991. <https://doi.org/10.1351/pac199163010141>.
- MOHEIMANI, N.R. Inorganic carbon and pH effect on growth and lipid productivity of *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp (Chlorophyta) grown outdoors in bag photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v.25, p.387–398, 2012.
- MOLINA, E, et al. Tubular photobioreactor design for algal cultures. **Journal of Biotechnology**, v.92, p.113–131, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00353-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00353-4).
- MONÇÃO, F.S. Et al. Microalgas e Biocombustíveis: Integração de Cadeias Produtivas. **Revista Virtual de Química**, v.10, n.4, p.999–1017, 2018. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180071>.
- MORAES, B.S., et al. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? **Applied Energy**, v.113, p.825–835, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.07.018>.
- MORAES, G. S. C. **Produção de biomassa algal e extração de óleo a partir da microalga *Chlorella Vulgaris***. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, 2018.
- MORTENSEN, K.Y.B.; RAINUZZO, J.K.; KNUTSEN, G. Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schiitt. **Journal of experimental Marine Biology and Ecology**, v.122, p.173-185, 1988. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(88\)90183-9](https://doi.org/10.1016/0022-0981(88)90183-9).

NAGARAJAN, D., et al. Resource recovery from wastewaters using microalgae-based approaches: a circular bioeconomy perspective. **Bioresource technology**, v.302, 122817, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122817>.

NAKANISHI, K. Chlorophyll rich and salt resistant *Chlorella*. **European Patent**, v.1, 2001.

NOGUEIRA, L. A. H; CAPAZ, R. S. Ethanol from Sugarcane in Brazil: Economic Perspectives. **Industrial Biorefineries White Biotechnol**, p. 237–46, 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00006-9>.

NUVOLARI, A. **Esgoto sanitário: coleta, transporte, tratamento e reuso agrícola**. Editora Blucher, 2.ed. São Paulo, 562p, 2011.

OGBONNA, J. C.; TANAKA, H. Light requirement and photosynthetic cell cultivation—Development of processes for efficient light utilization in photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v.12, p.207–218, 2000. <https://doi.org/10.1023/A:1008194627239>.

OGBONNA, J. C.; TANAKA, H. Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.82, n.6, p.558-564, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)81252-4](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)81252-4).

OLGUÍN, E. J. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. **Biotechnology Advances**, v.22, p.81–91, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(03\)00130-7](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(03)00130-7).

OLIVEIRA, B. G. de, et al. Greenhouse gas emissions from sugarcane vinasse transportation by open channel: A case study in Brazil. **Journal of Cleaner Production**, v.94, p.102–107, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.02.025>.

OQUIST, G. Effects of low temperature on photosynthesis. **Plant, Cell and Environment**, v.6, p.281–300, 1983.

ORTEGÓN, G.P. et al. Vinasse application to sugar cane fields: Effect on the unsaturated zone and groundwater at Valle del Cauca (Colombia). **Science of the Total Environment**, v.539, p.410-419, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.153>.

PARK, J. B. K; CRAGGS, R. J. Nutrient removal in high rate algal ponds with CO₂ addition. **Water Science and Technology**, v.63, p.1758–1764, 2011. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.114>.

PARK, J. B. K; CRAGGS, R. J. Wastewater treatment and algal production in high rate algal ponds with carbon dioxide addition. **Water Science and Technology**, v.61, p.633–639, 2010. <https://doi.org/10.2166/wst.2010.951>.

PARK, J; CRAGGS, R; SHILTON, A. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technology**, v.102, p.35-42, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.158>.

PARNAUDEAU, V. et al. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. **Bioresource technology**, v.99, n.6, p. 1553-1562, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.012>.

PARRON, L. M.; MUNIZ, D. H. de F.; PEREIRA, C. M. **Manual de procedimentos de amostragem e análise físico-química da água**. 2011. Disponível em:
<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/921050/manual-de-procedimentos-de-amostragem-e-analise-fisico-quimica-de-agua>. Acesso em: 23 ag. 2020.

PARSAEE, M.; KIANI, D.K.M.; KARIMI, K. A review of biogas production from sugarcane vinasse. **Biomass and Bioenergy**, v.122, p.117–125, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.034>.

PIORRECK, M.; BAASCH, K.; POHL, P. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. **Phytochemistry**, v.23, p.207-216, 1984.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80304-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80304-0).

POVEDA, M. M. R. **Integração do biogás de vinhaça na matriz energética de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo**. 2019. Teses (Doutorado em Ciências) -Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.
<https://doi.org/10.11606/T.105.2019.tde-26082019-115248>.

QUINTERO-DALLOS, V. et al. Vinasse as a Sustainable Medium for the Production of *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. **Water**, v.11, n.8, 14p. 2019.
<https://doi.org/10.3390/w11081526>.

RAMSUNDAR, P. et al. Assessment of municipal wastewaters at various stages of treatment process as potential growth media for *Chlorella sorokiniana* under different modes of cultivation. **Bioresource Technology**, v.227, p.82–92, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.037>.

RAS. M.; STEYER, J. P; BERNARD, O. Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. **Environmental Science and Bio/Technology**, v.12, p.153–164, 2013. DOI 10.1007/s11157-013-9310-6.

RATKOWSKY, D. A. et al. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. **Journal of Bacteriology**, v.154, p.1222–1226, 1983.

REN, Hong-Yu. et al. Hydrogen and lipid production from starch wastewater by co-culture of anaerobic sludge and oleaginous microalgae with simultaneous COD,

- nitrogen and phosphorus removal. **Water Research**, v.85, p.404–412, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.08.057>.
- RICHARDSON, B. et al. Effects of nitrogen limitation on the growth and composition of unicellular algae in continuous culture. **Journal of Applied Microbiology**, v.18, p.245–250, 1969. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201500391>.
- RICHMOND, A. **Biological Principles of Mass Cultivation of Photoautotrophic Microalgae**. In: RICHMOND, A.; HU, Q. Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. Editora John Wiley and Sons, 2 ed., p.726, 2013.
- RICHMOND, A. outdoor mass cultures of microalgae: biological principles, productionsystems. In: Richmond, A. (ED.). **Handbook of microalgae mass culture**. Florida: CRC Press, p.285-330, 1990.
- RICHMOND, A. Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. **Hydrobiologia**, v.512, p.33–37, 2004. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0944-7_5.
- RICHMOND, A; CHENG-WU, Z; ZARMI, Y. Efficient use of strong light for high photosynthetic productivity: interrelationships between the optical path, the optimal population density and cell-growth inhibition. **Biomolecular Engineering**, v.20, p.229–236, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(03\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00060-1).
- RIGANO, V. D. M. et al. The physiological significance of light and dark NH_4^+ metabolism in *Chlorella sorokiniana*. **Phytochemistry**, v.47, p.177-181, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00569-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00569-4).
- ROSSETTO, A. J. Utilização agrônômica dos subprodutos e resíduos da indústria açucareira e alcooleira. Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. **Fundação Cargill**, v.2, p.435-504, 1987.
- RUAS, G. S. et al. Remoção de matéria orgânica e nutrientes da vinhaça de cana-de-açúcar em um reator de microalgas-bactérias. **ARGAMASSA-Revista das Engenharias, Arquitetura e Urbanismo, Geografia, Gestão, Decisão e Memória**, v.1, n.2, p.6–16, 2018.
- RUIZ-MARTINEZ, A. et al. Microalgae cultivation in wastewater: Nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. **Bioresource Technology**, v.126, p.247–253, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.022>.
- SALVUCCI, M. E; CRAFTS-BRANDNER, S. J. Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. **Physiology Plant**, v.120, p.179–186, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.0173.x>.
- SÁNCHEZ, S. et al. Mixotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with olive mill wastewater as the nutrient medium. **Journal of Applied Phycology**, v.13, p.443-449, 2001. <https://doi.org/10.1023/A:1011929723586>.

- SANTANA, H. et al. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, v.228, p.133–140, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.075>.
- SANTOS, D. **Estudo do crescimento da microalga *Chlorella* sp.** Trabalho de diplomação (Graduação em Engenharia Química) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.
- SANTOS, P. S. et al. Does sugarcane vinasse composition variability affect the bioenergy yield in anaerobic systems? A dual kinetic-energetic assessment. **Journal of Cleaner Production**, v, 240, 118005, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118005>.
- SARRAFZADEH, M. H. et al. Evaluation of various techniques for microalgal biomass quantification. **Journal of Biotechnology**, v.216, p.90–97, 2015. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.10.010.
- SASI, D. **Biokinetic behaviour of *Chlorella vulgaris* in a continuous stirred bioreactor and a novel circulating loop photobioreactor.** 2009. Tese (Mestrado em Engenharia Química) - Colégio de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade de Saskatchewan, Saskatoon, 2009.
- SEIXAS, F.L., et al. Tratamento da vinhaça por adsorção em carvão de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v.39, p.172-179, 2016. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20160013>.
- SHEER, H. **The chlorophylls.** CRC Press, Boca Raton, 1991.
- SHEN, Y.; GAO, J.; LI, L. Municipal wastewater treatment via co-immobilized microalgal bacterial symbiosis: Microorganism growth and nutrients removal. **Bioresource Technology**, v.243, p.905–913, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.041>.
- SHIRAIWA, Y.; GOYAL, A.; TOLBERT, N.E. Alkalization of the medium by unicellular green during uptake of dissolved inorganic carbon. **Plant and Cell Physiology**, v.34, n.5, p.649-657, 1993. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078467>.
- SILVA, C. E. D. F.; ABUD, A. K. D. S. Anaerobic biodigestion of sugarcane vinasse under mesophilic conditions using manure as inoculum. **Revista Ambiente e Água**, v.11, n.4, p.763-777, 2016. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.1897>.
- SINGH, N. K.; PATEL, D. B. Microalgae for Bioremediation of Distillery Effluent. **Farming for Food and Water Security**, vol 10, 2012. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4500-1_4.
- SIQUEIRA, L. M.; DAMIANO, E. S. G.; SILVA, E. L. Influence of organic loading rate on the anaerobic treatment of sugarcane vinasse and biogás production in fluidized bed reactor. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous**

Substances and Environmental Engineering, v.48, p.1707–1716, 2013.
<https://doi.org/10.1080/10934529.2013.815535>.

SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SOLETTO, D. et al. Batch and fedbatch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. **Aquaculture**, v.243, p.217-224, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.10.005>.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.101, p.87–96, 2006. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>.

STERNER, R. W; ELSER, J. J. Ecological Stoichiometry: the Biology of Elements from Molecules to the Biosphere. Princeton University Press, 439p., 2002.
DOI:10.1515/9781400885695.

STREIT, N. M. et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, v.35, n.3, p.748-755, 2005.
<https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000300043>.

SUKACOVA, K.; TRTÍLEK, M.; RATAJ, T. Phosphorus removal using a microalgal biofilm in a new biofilm photobioreactor for tertiary wastewater treatment. **Water Research**, v.71, p.55-63, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.12.049>.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v.83, n.1, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7).

SUTHERLAND, D. L. et al. The effects of CO₂ addition along a pH gradient on wastewater microalgal photophysiology, biomass production and nutrient removal. **Water Research**, v.70, p.9–26, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.064>.

SYDNEY, E. B. et al. Microalgal biorefineries: Integrated use of liquid and gaseous effluents from bioethanol industry for eficiente biomass production. **Bioresource Technology**, v.292, 121955, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121955>.

SYDNEY, E.B. et al. Current developments and challenges of green technologies for the valorization of liquid, solid, and gaseous wastes from sugarcane ethanol production. **Journal of Hazardous Materials**, p.124059, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124059>.

SYRETT, P. J. **Nitrogen assimilation: Physiology and biochemistry of algae**. Academic Press, New York, p.171-183, 1992.

TELES, V. C. et al. Caracterização de biomassa da nova espécie de microalga verde *Micractinium* sp. EmbrapaLBA32 quando cultivada em meio à base de vinhaça utilizando fotobiorreatores. *In: Congresso Brasileiro de Química*, Goiânia, 2015.

- TELES, V. **Caracterização da biomassa das microalgas *Micractinium* sp. e *Chlamydomonas* biconvexa cultivadas em vinhaça e CO₂ para aplicações biotecnológicas**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Tocantins, Brasília, 2016.
- TELH, M. **Avaliação do uso de reator anaeróbio horizontal de leito fixo no tratamento de vinhaça sob condições termofílicas**. 2017. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.
- TINDALE, A. **Biology: A concise Revision Course for CXC**. Oxford University Press, London, Great Britain. 160p., 1988.
- TOMASELLI, L. **The microalgal cell**. In: RICHMOND, A.; HU, Q. Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. Editora John Wiley and Sons, 2 ed., p.3-19, 2004.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6^a edição, Editora Artmed, Porto Alegre, 2000.
- TORZILLO, G. et al. Biological constraints in algal biotechnology. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.8, p.338–348, 2003.
- TRAVIESO, L. et al. Assessment of a microalgae pond for post treatment of the effluent from an anaerobic fixed bed reactor treating distillery wastewater. **Environmental Technology**, v.29, p.985–992, 2008. <https://doi.org/10.1080/09593330802166228>.
- TREVISAN, E. et al. *Chlorella vulgaris* growth in different biodigested vinasse concentrations: Biomass, pigments and final composition. **Water Science and Technology**, v.82, 2020. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.192>.
- UNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar. **Vinhaça: biofertilizante e energia sustentável 2019**. Disponível em: <https://unica.com.br/noticias/vinhaca-biofertilizante-e-energia-sustentavel/>. Acesso em: 26 ag. 2021.
- VALDÉS, F. J. et al. Estimation of CO₂ stripping/CO₂ microalgae consumption ratios in a bubble column photobioreactor using the analysis of the pH profiles. Application to *Nannochloropsis oculata* microalgae culture. **Bioresource Technology**, v.119, p.1–6, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.120>.
- VALENTE, J. P. S; PADILHA, P. M; SILVA, A. M. M. Oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) como parâmetros de poluição no ribeirão Lavapés/Botucatu - SP. **Eclética Química**, v.22, p.49-66, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0100-46701997000100005>.
- VELOSO, V. et. al. Lipid production by *Phaeodactylum tricornutum*. **Bioresource Technology**, v.38, p.115-119, 1991 [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90141-6](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90141-6).

- VIEIRA, J. G. et al. Uptake of phosphorus from dairy wastewater by heterotrophic cultures of cyanobacteria. **Desalination and Water Treatment**, v.40, p.1-3, 2012. <https://doi.org/10.1080/19443994.2012.671249>.
- VOGEL, F. et al. The mean oxidation number of carbon (MOC): usefull concept for describing oxidation processes. **Water Research**, v.34, p.2689-2702, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00029-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00029-4).
- WALKER, D.A. Biofuels, facts, fantasy and feasibility. **Journal of Applied Phycology**, v.21, p.509–517, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9446-5>.
- WATANABE, M.M.; TANABE, Y. **Biology and Industrial Potential of *Botryococcus braunii***. In: RICHMOND, A.; HU, Q. Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. Editora John Wiley and Sons, 2 ed., p.369-387, 2013.
- WEISSMAN, J. C; GOEBEL, R. P. **Factors affecting the photosynthetic yield of microalgae**. In: Johnson, D. A. FY 1986 Aquatic Species Program Annual Report, Colorado, p.139–168, 1987.
- WENTZEL, M. C. et al. Batch test for characterization of the carbonaceous materials in municipal wastewater. **Water SA**, v.25, p.327-335, 1999.
- WOOD, A. M.; EVERROAD, R. C.; WINGARD, L. M. Measuring Growth Rates in Microalgal Cultures. In: ANDERSEN, R. A. Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press, p.269-286, 2005.
- WU, Y. H. et al. Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition. **Bioresource Technology**, v.112, p.193–198, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.037>.
- XI, L. et al. Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. **Engineering in Life Sciences**, v.9, p. 1402–1411, 2010. <https://doi.org/10.1002/elsc.200800111>.
- YEN, H. W. et al. Microalgae based biorefinery—from biofuels to natural products. **Bioresource Technology**, v.135, p.166–174, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.099>.
- ZHANG, T.Y. et al. Domestic wastewater treatment and biofuel production by using microalga *Scenedesmus* sp. ZTY1. **Water Science and Technology**, v.69, p. 2492-2496, 2014. <https://doi.org/10.2166/wst.2014.160>.
- ZHU, J; RONG, J; ZONG, B. Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. **Chinese Journal of Catalysis**, v.34, p.80–100, 2013. [https://doi.org/10.1016/S1872-2067\(11\)60497-X](https://doi.org/10.1016/S1872-2067(11)60497-X).
- ZHU, L. D. et al. Microalgal biofuels: Flexible bioenergies for sustainable development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.30, p. 1035-1046, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.11.003>.

ZOLIN, C. A. et al. Estudo exploratório do uso da vinhaça ao longo do tempo: I. Características do solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, p.22-28, 2011.

ZORN, S.M.F.E. et al. Extração de Óleo Microalgal por Solventes Orgânicos: Uma Alternativa para a Produção de Biodiesel. **Janus**, v.13, n.24, 2016.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

Artigo escrito nas normas da revista *Algal Research*.

Evaluation of microalgal growth under different cultivation conditions using vinasse as raw material.

Samantha Naomi Monfredini Alencar¹, Thiago Silva Ramos¹, João Pedro Moreira Silqueira², Luciene Alves Batista Siniscalchi¹, Paula Peixoto Assemany¹, Adriano Viana Ensinas².

¹ Department of Environmental Engineering, Federal University of Lavras (Universidade Federal de Lavras), MG, Brazil

² Department of Engineering, Federal University of Lavras (Universidade Federal de Lavras), MG, Brazil

Post: *Federal University of Lavras, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP 37.200-900, Lavras-MG, Brasil.

Abstract

Vinasse is one of the residues generated in ethanol production from sugarcane, with an estimated production of about 13 L for every 1 L of alcohol. Vinasse has a polluting potential due to its low pH value, high concentration of organic matter, and nutrients such as nitrogen, phosphorus, potassium and phenolic compounds, characteristics that can be harmful to the environment when improperly disposed into water bodies or the environment. Simple and low cost solutions for the treatment of this wastewater are highly recommended. One of the promising alternatives is microalgae-based biotechnology, which, in addition to microalgae bioremediation capacity, may produce biomass for biofuel production or other valorization routes. Thus, this study evaluated microalgae cultivation under different growth mediums using vinasse as raw material to identify the best growth conditions. To this end, microalgae cultures were carried out with dilutions in both distilled water and BG11 media and vinasse influence on microalgae growth and its potential for bioremediation was verified. The results showed that the cultivation with 100% vinasse and 50% vinasse (BG11 and distilled water) did not present a microalgae cell growth. Cultivation with 10% vinasse in BG11 showed better maximum growth rate ($\mu_{max} = 0.48 \text{ d}^{-1}$) compared to cultivation with distilled water ($\mu_{max} = 0.23 \text{ d}^{-1}$). Cultivations with 10% vinasse (BG11 and distilled water) and control showed 100% efficiency in removal of N-NH₄⁺ and P, which demonstrates the possibility of using microalgae for bioremediation of vinasse. However, specifically for nitrogen, it was found that the main removal mechanism was volatilization, with no considerable recovery of the nutrient in the form of biomass.

Keywords: Algal biomass, resource recovery, agro-industrial effluent, wastewater treatment.

1. INTRODUCTION

Agro-industrial residues can be a polluting source to the environment depending on the raw material or the technology used in the production process, mainly due to their high concentrations of nutrients such as nitrogen and phosphorus [2]. Sugarcane is considered one of the most produced raw materials globally, reaching around 1.5 billion t.year⁻¹, mainly used to produce sugar and ethanol [3].

In Brazil, the sugar-alcohol sector plays a vital role in the country's economy, mainly due to the high production of ethanol as an alternative for replacing fossil fuels [4]. Ethanol from sugarcane has lower greenhouse gas (GHG) emissions than other ethanol sources. However, in its transformation process, for every 1L of alcohol, about 13L of waste called vinasse are produced [5,6]. Vinasse is often used in the fertigation of sugarcane crops because it is a nutrient-rich by-product [7]. However, it has a high polluting potential, 100x greater when compared to domestic sewage [8]. Its inappropriate disposal can cause soil pollution and eutrophication of water bodies due to heavy metals and nutrients accumulation [9]. Vinasse is an effluent with acid pH and high concentrations of organic matter (soluble chemical oxygen demand values may range 14,517-55,167 mg L⁻¹, and biochemical oxygen demand of 5,05–47,66 mg L⁻¹). As nutrients, it has nitrogen, phosphorus and potassium in its content, with concentrations of 40–4,004 mg L⁻¹, 1–190 mg L⁻¹ and 40-7,830 mg L⁻¹, respectively [10,11]. However, these characteristics may vary according to the fermentation and distillation processes [12].

Thus, several studies seek treatment solutions for this waste [13]. Among them, it stands out that vinasse can be an alternative for microalgae cultivation [14,15]. Microalgae are eukaryotic, single-celled, and photosynthetic microorganisms present in both freshwater and saline aquatic ecosystems. They develop under photoautotrophic

conditions; however, with the presence of organic compounds, they can grow in heterotrophic or mixotrophic conditions [16]. In addition, microalgae can assimilate macronutrients such as nitrogen and phosphorylated substances for their development, making them an innovative alternative for wastewater treatment [17,18].

The treatment of wastewater using microalgae does not require the application of hazardous chemicals, has a low cost compared to other treatment systems and has the possibility of high value-added products obtaining through algal biomass valorization [19]. Microalgae have vitamins, proteins, essential amino acids, fatty acids, among other bioactive compounds in their composition [20]. Therefore, they can generate essential products with various biotechnological applications, such as raw materials for biofuels, being a promising renewable energy source [21].

Several studies have evaluated the treatment of vinasse using microalgae [2,22,23]. However, the potential for microalgae production using vinasse is still poorly understood, and few studies present dilutions and pre-treatments necessary for the microalgae survival in such an environment [22]. The dilution is intended to reduce the concentration of suspended solids and consequently turbidity and toxic compounds that are present, such as phenols, as well as attenuating the typical dark color. In addition to the toxicity of some compounds for microalgae cultivation, they can block the light penetration into the culture medium, limiting the photosynthetic activity, essential for the photosynthetic organism's development. Moreover, the high organic load of this effluent can favor the development of heterotrophic microorganisms, such as bacteria, which compete with microalgae for space and nutrients [24], hindering the establishment of autotrophic organisms.

On the other hand, with dilution, the concentration of macro and micronutrients is also reduced, which may limit the development of microalgae and require, extra

operational strategies for a full-scale application. Therefore, it is imperative to evaluate the best concentration of vinasse or other operational strategies so that microalgal growth can be optimized, aiming at bioremediation and nutrient recovery from a complex effluent with major challenges for the application as manageable and low-cost treatment technology.

In this sense, this study evaluated microalgae cultivation under different growth conditions using vinasse as a raw material (undiluted vinasse and 10 and 50% vinasse addition) to identify the best culture conditions. To this end, cultures and dilutions were carried out both in distilled water and in a medium with nutrient enrichment (BG11), in order to verify the influence of vinasse as medium on microalgae growth, in addition to understanding the possibility of recovering nutrients present in vinasse from the cultivation of microalgae.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Development of the inoculum

An experimental culture tank, in fiberglass, with a capacity of 100L, was installed in outdoor conditions in the Wastewater Treatment Plant of the Federal University of Lavras (WWTP UFLA) (coordinates 21°13'49.1 "S 44°59'22.9 "W), which received 40L of sanitary effluent from an Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor (UASB). The UASB reactor has a useful volume of 62.3 m³, with a theoretical hydraulic retention time (HRT) of approximately 8 hours.

2.2. Initial culture in Erlenmeyers in the laboratory

After 15 days, 300 mL of the outdoor culture were transferred to three 1L (10% v/v) Erlenmeyers, each containing 900 mL of previously prepared BG11 artificial

culture medium [25]. Cultures were monitored every 2 days for cell counting through the Neubauer chamber, under an optical microscope, with 40x magnification. After 7 days, when a greater number of cells was observed ($\sim 10^7$ cells mL⁻¹) through counting, the experiment was started, diluting 10% of this inoculum to media with vinasse in BG11 and distilled water (Table 2). The inoculum was mainly composed of chlorophyte microalgae, with the presence of the genera *Chlorella* sp., *Nephrocytium* sp. and *Scenedesmus* sp., in addition to the filamentous cyanobacteria family Pseudanabaenaceae. The taxonomic identification of organisms based on morphological characters was updated to the most recently accepted, Cavalier-Smith [26], and the correct nomenclature of the species was consulted and updated according to Bicudo and Menezes [27].

2.3. Sampling of vinasse used as a culture medium

The vinasse used in the experiment was collected at the output of a distiller from a typical Brazilian liquor industry located in the municipality of Lavras – MG, which has artisan production in copper stills. An average of 35,000 L.year⁻¹ of alcoholic drink is produced, and all the effluent is later used in the fertigation of the local sugarcane crop [28].

The vinasse was autoclaved at 125 °C for two hours to inactivate microorganisms, mainly bacteria, and then centrifuged at 3,000 rpm for 5 minutes to remove suspended solids. The physical and chemical characterization of the vinasse after the pre-treatment used in this study is presented in Table 1.

Table 1 - Initial characterization of the vinasse after the pre-treatment.

Variable	Value
pH	3.7
Soluble COD (mg L ⁻¹)	19,767.7
Soluble P (mg L ⁻¹)	6.4
TKN (mg L ⁻¹)	40.1
Ammonia Nitrogen (mg L ⁻¹)	5.8
TSS (mg L ⁻¹)	75.0
VSS (mg L ⁻¹)	60.0
FSS (mg L ⁻¹)	15.0
Total Alkalinity (mg L ⁻¹)	ND
Volatile Acids (mg L ⁻¹)	2682.0

Legend: COD = Chemical Oxygen Demand; P = phosphorus; TKN = Total Kjeldahl Nitrogen; TSS = Total Suspended Solids; VSS = Volatile Suspended Solids; FSS = Fixed Suspended Solids; ND = Not Detected, value less than the detection limit of the method.

2.4. Microalgae cultivation

Six experimental cultivation conditions were carried out, each condition in triplicate, in which the vinasse (Table 1) was added to the BG11 medium [25] or distilled water together with the previously cultivated microalgae inoculum. The cultivation conditions were: control (100% BG11), 10% vinasse in BG11 medium, 50% vinasse in BG11 medium, 10% vinasse in distilled water, 50% vinasse in distilled water and 100% vinasse. The BG11 artificial medium was prepared in the laboratory according to Andersen [25], and the pH was corrected to 7.5 using HCl or NaOH.

After mixing the vinasse with BG11 medium or distilled water, the pH values of all cultures were corrected to 7, and then the inoculum was added. The cultures were kept for 14 days, at a controlled temperature of 30 °C, with 11,000 lux and a 12-hour photoperiod, and received 10% inoculum (10% v/v).

2.5. Monitoring of microalgae growth

In order to monitor biomass growth, microalgal cell counts, volatile suspended solids (VSS) and chlorophyll-*a* (chl *a*) analyzes were performed (see Table 3 for more details of methodology and frequency of analysis). Microalgae counts were performed every two days using the Neubauer Chamber. In addition, the C-Mount, microscope camera - HDMI [Kern ODC 851] was used, which was coupled to the microscope and reproduced the image in real-time on the computer. The samples were gently homogenized to avoid damaging the organisms, and an aliquot was removed and inserted into the counting chamber, considered individuals as the counting unit. From the counts, microalgal growth curves were constructed and the growth phases were identified. Additionally, the average and maximum microalgal growth rates (μ mean and μ max) [29] were calculated for each culture condition according to Equations 1 and 2, where N_1 and N_2 are the cell densities (cells mL⁻¹) at time d_1 and d_2 (number of experiment days), respectively.

$$\mu_{mean} = \frac{\ln(N_2) - \ln(N_1)}{d_2}$$

(Equation 1)

$$\mu_{maximum} = \frac{\ln(N_2) - \ln(N_1)}{d_2 - d_1}$$

(Equation 2)

2.6. Monitoring of vinasse bioremediation

To evaluate the growth of microalgae and also bioremediation of vinasse, physical and chemical analyzes were performed before, during and after cultivation: pH, Ripley alkalinity and volatile acids, total suspended solids (TSS), fixed (FSS), and

volatiles (VSS), soluble chemical oxygen demand (COD), soluble phosphorus (P), total Kjeldahl nitrogen (TKN), total ammonia nitrogen and chl-*a* (Table 2). The fraction of free ammonia (NH₃) present in total ammonia nitrogen was determined from Equation 3 [30], where T and pH are the temperature and pH of the culture medium, respectively.

$$\frac{NH_3 \text{ livre}}{Amônia \text{ total}} (\%) = \frac{100}{1+10^{[0,09018+(\frac{2729,92}{T+273,20})]-pH}} \quad (\text{Equation 3})$$

Table 2 – Physical and chemical analyzes performed to verify the bioremediation of vinasse via microalgae cultivation.

Analyzes	Method	Frequency
pH	PoliControl pH250 meter	Every 2 days
Suspended solids (TSS, FSS, VSS)	APHA [31] and method 2540	1st and 14th day of cultivation
Soluble COD	APHA [31], method 5220D, with 0.45µm membrane filtered samples	1st and 14th day of cultivation
Ammonia Nitrogen	APHA [31] and method 4500-NH ₃ B and C	1st and 14th day of cultivation
TKN	Micro-Kjeldahl Method, adapted from Kjeldahl [32], quoted by Vogel [33]	1st and 14th day of cultivation
Soluble P	APHA [31] and 4500-P E method, adapted from Matos [34], with 0.45µm membrane filtered samples	1st and 14th day of cultivation
Chlorophyll <i>a</i>	Nush [35], NEN [36] and APHA [31]	1st, 7th and 14th day of cultivation

2.7. Statistical analysis

The results that met the normality criterion were analyzed using ANOVA and Tukey's test, observing the significance of the coefficients at the 5% level, using the programming language R 1.1.447 [37]. For Spearman's correlation, also using the R language, the following variables were tested: pH, temperature and microalgae cell

count, testing the significance of the coefficient through the air quality data analysis package [38].

3. Results and Discussion

3.1. Initial characterization of the culture medium

After the inoculum preparation, all cultures were characterized again to quantify nutrients, solids and chl *a* (Table 3).

Table 3 - Initial characterization of the different culture conditions (mean values and standard deviation in parentheses).

Culture	Variable						
	pH	COD (mg L ⁻¹)	TKN (mg L ⁻¹)	N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	P (mg L ⁻¹)	VSS (mg L ⁻¹)	Chl <i>a</i> (mg L ⁻¹)
Control	9.6 (0.3)	0 (35.2)	0 (0.0)	0.29 (0.25)	1.12 (0.54)	31.88 (7.49)	0.20 (0.11)
10% _b	7.1 (0.4)	1,424.42 (324.28)	8.19 (2.98)	0.29 (0.25)	1.66 (0.51)	64.44 (22.0)	0.17 (0.06)
50% _b	6.8 (0.1)	6,388.38 (2,387.31)	28.03 (3.26)	2.37 (0.99)	2.61 (1.02)	85.56 (8.22)	0.09 (0.03)
100%	6.8 (0.0)	16,231.22 (4,736.97)	43.13 (2.69)	4.75 (0.75)	4.25 (1.28)	123.33 (13.22)	0.22 (0.06)
10% _a	7.2 (0.4)	980.45 (594.61)	6.04 (0.74)	0.57 (0.66)	0 (0.03)	46.25 (22.24)	0.18 (0.06)
50% _a	6.8 (0.3)	11,679.33 (3,022.75)	26.3 (7.47)	2.37 (0.38)	1.68 (0.7)	71.67 (10.40)	0.16 (0.06)

Legend: a = treatment with the addition of distilled water, b = treatment with the addition of

BG11.

3.2. Variation of pH values under different growth conditions

Cultivation with 50% vinasse in BG11, 50% vinasse in distilled water, and 100% vinasse maintained the pH below 7 throughout the experimental period (Figure 1). The maximum pH values were 6.8 for the cultures with 50% vinasse in distilled

water and 100% vinasse, and 7.0 for the cultivation with 50% vinasse in BG11. These results were inferior to those obtained by the control and the culture with 10% of vinasse. The development of algal biomass directly influences pH variations due to photosynthetic activity, and this variable is one of the most critical factors for microalgae cultivation. The availability of carbon varies with pH, which can interfere with the availability of macro and micronutrients, in addition to the presence of organic matter, which consequently interfere with microalgal growth [39].

The control (BG11 without the addition of vinasse), 10% vinasse in BG11, and 10% vinasse in distilled water showed an increase in pH throughout the cultivation, obtaining maximum pH values of 10.3, 9.6, and 8.9, respectively. This behavior may be due to the greater amount of CO₂ assimilated by microalgae than the amount produced by bacteria or available in the culture medium in the form of alkalinity. CO₂ is produced by bacteria during the degradation of organic matter and is assimilated by microalgae during photosynthesis. However, when the amount of assimilated CO₂ is greater than the amount produced, there is an increase in pH, indicating carbon limitation in the culture medium.

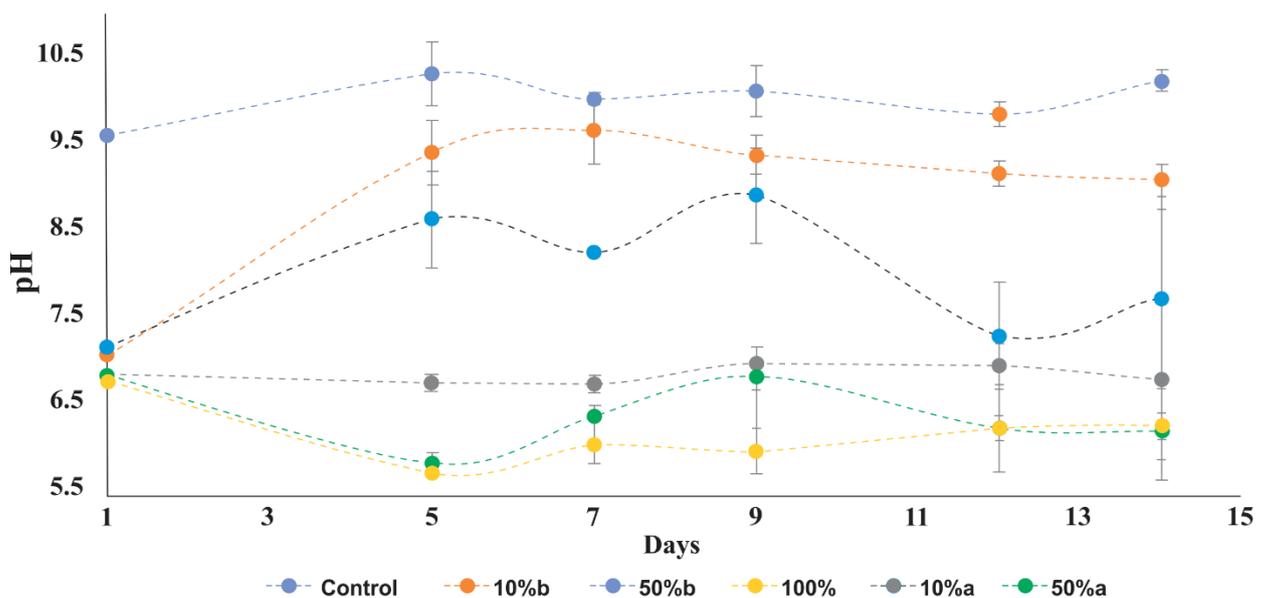


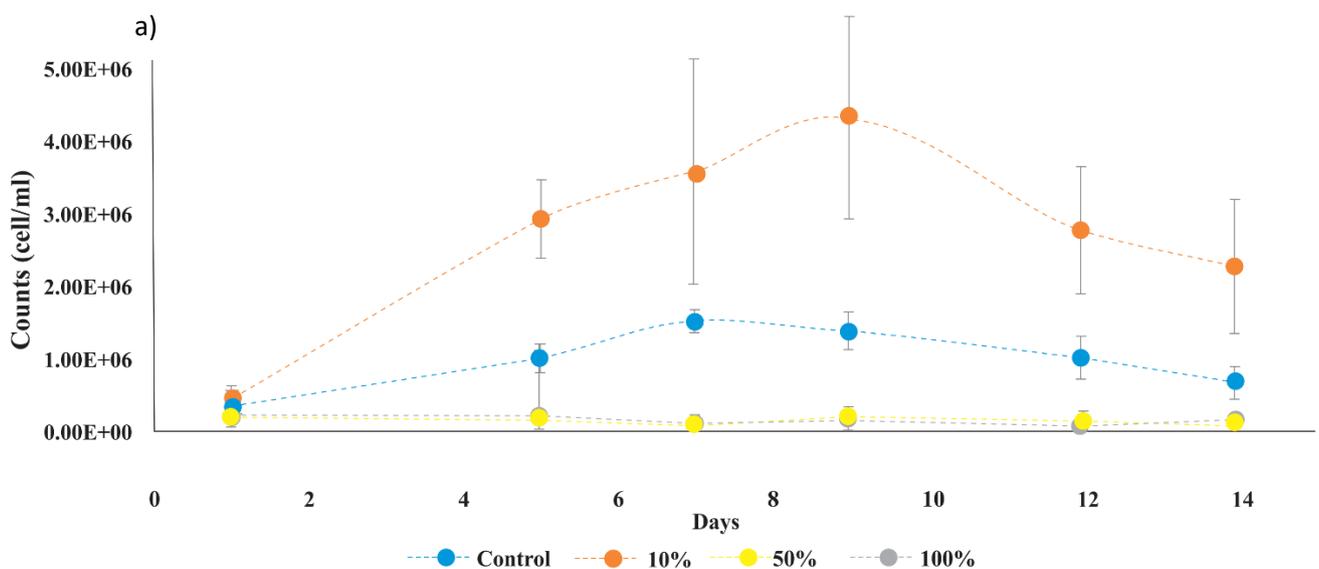
Figure 1 - pH variation over the cultivation period: control (BG11 without the addition of vinasse), 10%b = 10% vinasse in BG11, 50% b = 50% vinasse in BG11, 100% = 100% vinasse (without dilution); 10%a = 10% vinasse in distilled water, 50% a = 50% vinasse in distilled water.

3.3. Microalgal growth assessment

The predominant phytoplankton community in the cultures was composed of morphologies typically related to the phylum *Chlorophyta* (chlorophytes), with cells similar to the genera *Chlorella* sp., *Nephrocytium* sp. and *Scenedesmus* sp., also identified in the inoculum (item 2.1).

3.3.1. Microalgae cell count

In Figures 2a and 2b the cell growth behavior of each culture condition is presented. Cultivation with 10% vinasse in BG11 and 10% vinasse in distilled water had maximum cell counts of 4.35×10^6 cells ml^{-1} and 2.12×10^6 cells ml^{-1} respectively on day 9, and the control had its maximum cell count of 1.54×10^6 cells ml^{-1} at day 7. However, cultures with 50% vinasse in BG11, 50% vinasse in distilled water, and 100% vinasse did not show cell growth.



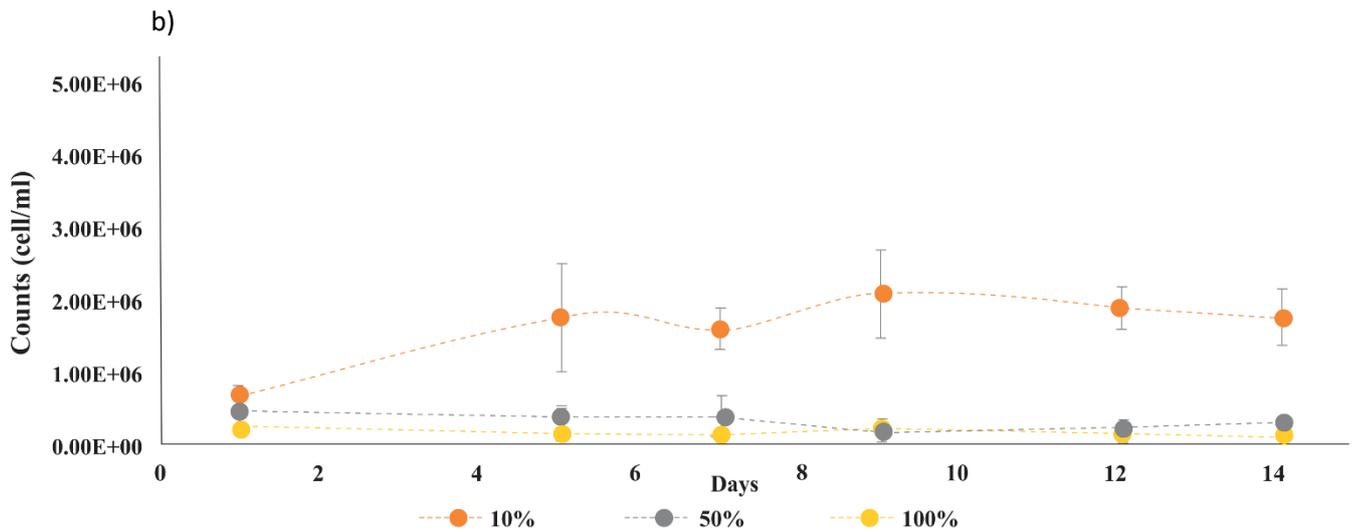


Figure 2 - Microalgae cell count (cells.mL⁻¹) throughout the cultivation period: a) control (BG11 without the addition of vinasse), 10% = 10% vinasse in BG11, 50% = 50% vinasse in BG11, 100% = 100% vinasse (undiluted); b) 10% = 10% vinasse in distilled water, 50% = 50% vinasse in distilled water, 100% = 100% vinasse (without dilution).

Figure 3 shows the correlation between the number of cells, pH, and temperature. It can be seen that there was a moderately high correlation, in which the number of cells and pH values were positively related in all culture conditions, showing a significant difference ($p = 2.869e-07$). Thus, it is confirmed that there is a direct influence of the photosynthetic activity of microalgae in development on pH variations, as previously mentioned in item 3.2.

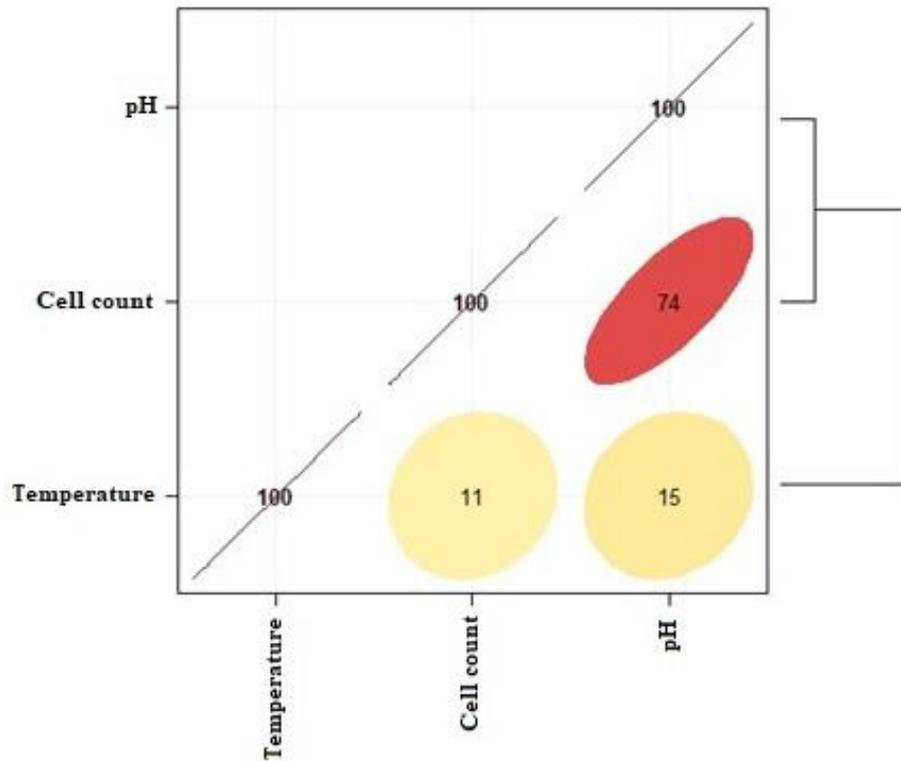


Figure 3 - Correlation between the number of cells (cell count), pH and temperature of all cultures conditions.

3.3.2. Chlorophyll *a*

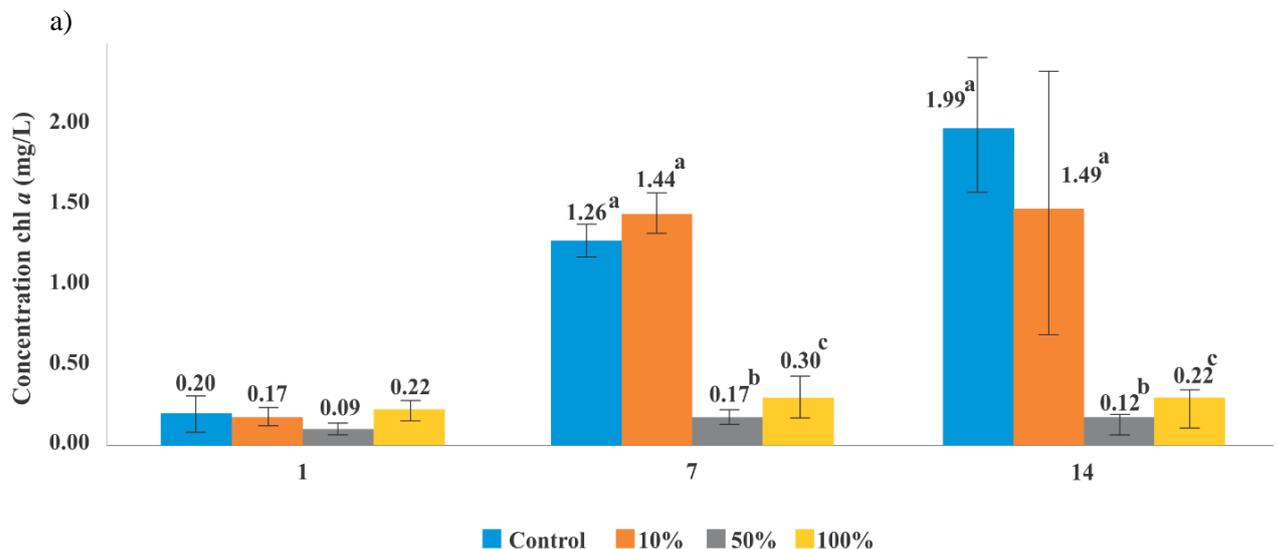
Chl *a* concentrations on the 1st, 7th, and 14th day of BG11 cultures are shown in Figure 4a. On the 7th day, the cultivation with 10% vinasse had the highest concentration of chl *a*, showing a significant difference compared to the others with the addition of vinasse on the same day ($p < 0.05$), confirming the results of counts shown in Figure 2a. On the 14th day, both the control and the 10% showed a significant difference ($p < 0.05$) in relation to the 50% and 100%, but they were not different from each other ($p > 0.05$). This result indicates that the concentration of 10% of vinasse did not cause inhibition of microalgal growth.

Results for the cultivations in distilled water are shown in Figure 4b, in which the cultivation with 10% vinasse was the condition with the highest concentration of chl

a on the 14th day, showing a significant difference from the other cultures with 50% vinasse in distilled water and 100% vinasse ($p < 0.05$). The condition with 50% vinasse in both BG11 and distilled water and the 100% vinasse culture showed a low concentration of chl *a* during the entire cultivation period, confirming the results of the number of cells as mentioned earlier (item 3.3.1).

Furthermore, it was possible to verify that the cultures with 10% vinasse in BG11 did not show significant differences ($p > 0.05$) from the cultures with 10% vinasse in distilled water. However, the control was different ($p < 0.05$) from the cultures with 10% vinasse in distilled water, showing a higher concentration of chl *a* at the end of the cultivation. The control is a purer medium compared to cultures with the presence of vinasse, presenting a low presence of heterotrophic microorganisms, which may justify such behavior.

Candido and Lombardi [40] obtained a high concentration of chl *a* in the cultivation of *C. vulgaris* carried out with 60% vinasse (4.0 mg L⁻¹). However, different from the present study, the vinasse used was pretreated by filtration, favoring microalgae cell growth.



b)

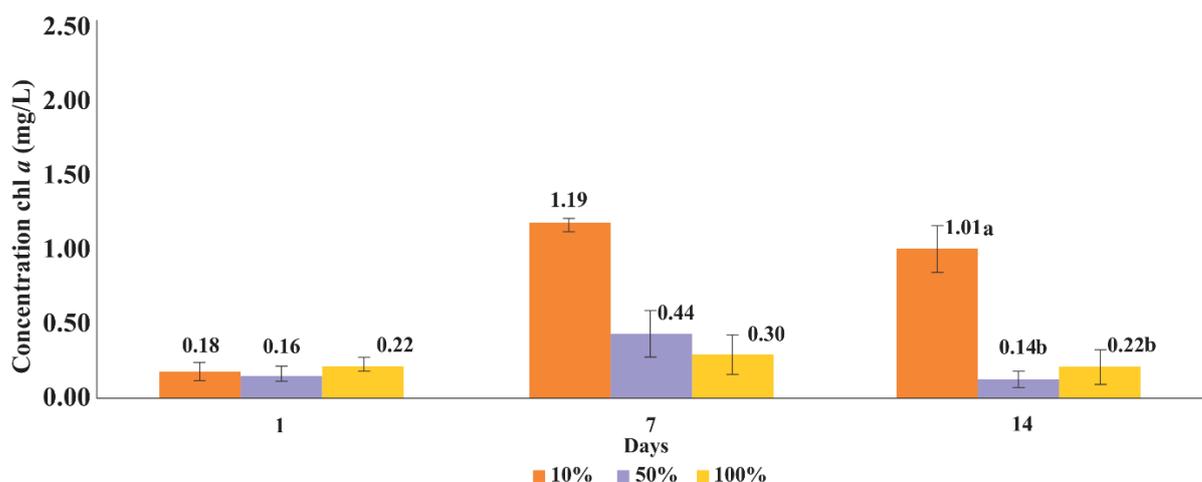


Figure 4 - Chl *a* concentration on the 1st, 7th, and 14th day for each culture condition: a) control (BG11 without the addition of vinasse), 10% and 50% vinasse in BG11 and 100% vinasse; b) 10% and 50% vinasse in distilled water and 100% vinasse. Legend: a, b = different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$).

3.3.3. Microalgae growth rate

Table 4 shows the average (μ mean) and maximum (μ max) growth rates for the first nine days when the highest cell density was identified through the cell counts.

The values of μ mean and μ max of the cultures with 50% vinasse in BG11 and 100% vinasse were not presented because there was no cell growth. This result may have occurred due to the low pH values, which remained below 7 throughout the growth period, in addition to the low chl *a* and high turbidity observed. Thus, it can be suggested that the high concentration of vinasse in the culture medium may be an inhibiting factor for microalgae growth. In general, vinasse has a dark color, composed of 93% water and 7% minerals and organic solids [41]. It also has a high organic load, with a high concentration of COD and organic acids (see Table 1), and other compounds such as phenols, which in larger quantities are harmful to microalgae [41].

For BG11 cultures, the control (BG11 without the addition of vinasse) and 10% vinasse addition showed no significant difference ($p > 0.05$) in the μ mean values, which indicates that the addition of 10% of vinasse did not inhibited microalgal growth. The

control presented μ mean = 0.19 d⁻¹, which, despite the high pH value throughout the cultivation, did not show significant growth compared to cultures with vinasse. The cultivation with 50% vinasse in BG11 did not show average growth (0.0 d⁻¹). The cultures with 10% vinasse both in BG11 and in distilled water showed no significant difference ($p>0.05$), confirming the chl *a* results presented.

Rezende et al. [42] evaluated the feasibility of vinasse addition in *Spirulina maximum* cultivation. They verified that the cultivation with 1% vinasse addition in heterotrophic condition (with no illumination) presented a better growth rate (μ max. = 1.02 d⁻¹) compared to the cultivation without vinasse addition in autotrophic condition (μ max. = 0.97 d⁻¹) and 0.1% vinasse in heterotrophic condition (μ max. = 0.54 d⁻¹). However, the growth rate was lower for cultivation with 0.1% and 1.0% of vinasse addition in mixotrophic condition, presenting μ max. = 0.28 d⁻¹ and 0.14 d⁻¹, respectively, approaching the values found in the present study for 10% of vinasse addition. According to the authors, the use of vinasse as a means of supplementing cultures under heterotrophic conditions can accelerate the growth of microalgae.

Regarding μ max, the treatment with 10% vinasse in BG11 had the highest value, showing difference significant difference from the cultivation with 10% vinasse in distilled water ($p<0.05$), although the concentration of chl *a* did not showed significant difference.

Table 4 - Mean (μ mean) and maximum (μ max.) growth rates during 9-day cultivation (standard deviation between parentheses).

Culture	μ mean (d ⁻¹)	μ max (d ⁻¹)
Control	0.19 (0.10)	0.34 (0.22)
10% _b	0.25 (0.07)	0.48 (0.11)

10%_a

0.12 (0.03)

0.23 (0.10)

Legend: a = treatment with the addition of distilled water, b = treatment with the addition of BG11.

3.3.4. Chl *a* / VSS ratio

To evaluate the biomass characteristic, the concentrations of chl *a* and VSS were related. The culture with the highest chl *a*/VSS ratio was the control (BG11 without the addition of vinasse) with 1.55% (Table 5). This showed a significant difference from the other cultures in BG11 ($p < 0.05$). Concerning the cultures in distilled water, the cultivation with 10% vinasse had the greatest chl *a*/VSS ratio, significantly different from the other cultures ($p < 0.05$). However, cultures with 10% vinasse in both BG11 and distilled water showed a low chl *a*/SSV ratio despite the microalgal growth verified through the cell counts (Figure 2) and the chl *a* concentration (Figure 3). This result can be explained by the presence of VSS in the added vinasse. In addition, it appears that all cultures with vinasse addition, either in BG11 or distilled water, had a chl *a*/VSS ratio $< 1\%$, which indicates a large presence of bacterial biomass in relation to algal biomass, which may also reflect stress of algal cells suffered by predation or competition for nutrients [24].

Table 5 - Concentrations of chl *a*, VSS and the chl *a*/VSS ratio (%) after 14 days of cultivation.

Culture	Chl <i>a</i> (mg L ⁻¹)	VSS (mg L ⁻¹)	Chl <i>a</i> /VSS	%
Control	1.99 (0.43)	128.29 (4.81)	0.01554	1.55
10% _b	1.49 (0.82)	454.81 (18.63)	0.00327	0.33
50% _b	0.12 (0.05)	358.02 (71.38)	0.00034	0.03
100%	0.22 (0.12)	523.02 (74.6)	0.00041	0.04
10% _a	1.01 (0.15)	502.83 (61.81)	0.00200	0.20
50% _a	0.14 (0.06)	260.90 (13.62)	0.00052	0.05

Legend: a = treatment with the addition of distilled water, b = treatment with the addition of BG11.

3.4. Biomass production

The values of differences in initial and final concentrations of VSS, productivity values of total biomass (VSS) at the end of 14 days of cultivation and chl *a* on the 7th and 14th day of cultivation are presented in Table 6. It is important to emphasize that the total biomass does not include only algal or photosynthesizers organism biomass, but all organisms, including mainly bacterial biomass (as shown in Table 5).

Regarding the cultivations in BG11, the control (BG11 without the addition of vinasse) presented lower total biomass productivity than the others, however, the chl *a* productivity was close to the cultivation with 10%. Cultivation with 10% showed a higher total biomass productivity value than the control and 50%. The low biomass productivity of the control may be due to the low presence of heterotrophic microorganisms present in the medium, but this fact did not interfere with the microalgal productivity as can be confirmed by the chl *a* concentration and also by the chl *a*/VSS ratio.

In the study carried out by De Melo et al. [2], preliminary tests were carried out with different concentrations of vinasse (0.5%, 1%, 2%, 4%, and 6%) to identify the ideal concentration for the cultivation of *C. vulgaris*. The highest yield of total biomass ($0.09 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) was found when using a 2% concentration of vinasse in the culture medium.

The highest value of total biomass productivity was obtained in cultivation with 100% vinasse ($37.36 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), a similar value obtained by Calixto et al. [43], using *Chlorella* sp. (D101Z) in a medium with 100% vinasse. Cultures with 50% vinasse in BG11 and 100% vinasse showed high total biomass productivity, despite low chl *a* productivity, a behavior also observed in cultures with distilled water. In the study carried out by Candido and Lombardi [40], the microalgae of the species *C. vulgaris*

cultivated in a medium with 60% vinasse diluted in distilled water presented a higher growth rate ($\mu_{\max} = 1.6 \text{ d}^{-1}$) compared to the cultivation carried out in BG11 artificial medium ($\mu_{\max} = 1.2 \text{ d}^{-1}$), however, the productivity of chl *a* was higher in the medium with BG11 than with vinasse. This behavior is observed because the biomass productivity represented in these cases is mainly from non-photosynthetic organisms and/or bacteria.

In most cases, the concentration of vinasse considered ideal for the development of microalgae was below 10%, which can be confirmed through the results of chl *a* productivity observed in the present study. It is verified that cultivation with 10% vinasse both in BG11 and in distilled water presented chl productivity corresponding to the total biomass yields, which can be suggested that low concentration vinasse favored microalgal growth.

Santana et al. [23] when performing the cultivation of *Chlamydomonas biconvexa* (Embrapa LBA40) in clarified vinasse without dilution, obtained biomass productivity of $0.22 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. However, it should be considered that, in this case, the vinasse was submitted to clarification, sedimentation, centrifugation, and then autoclaved, in addition to using an isolated and pre-selected strain of microalgae that presents greater biomass productivity. Therefore, such factors may have contributed to obtaining better microalgal growth.

Table 6 - Differences in initial and final concentrations of VSS, total biomass productivity (VSS) on the 14th day and chlorophyll productivity on the 7th and 14th day of cultivation.

Culture	VSS difference	Productivity ($\text{mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$)
---------	----------------	--

	(mg L ⁻¹)	Total biomass	Chl <i>a</i> (7th day)	Chl <i>a</i> (14th day)
Control	96.41	9.16 (4.82)	0.18 (0.11)	0.14 (0.43)
10% _b	390.37	32.49 (18.63)	0.21 (0.13)	0.11 (0.82)
50% _b	272.46	25.57 (71.38)	0.02 (0.04)	0.01 (0.05)
100%	399.69	37.36 (74.57)	0.04 (0.13)	0.02 (0.12)
10% _a	456.58	35.92 (61.81)	0.17 (0.02)	0.07 (0.15)
50% _a	189.23	18.64 (13.62)	0.06 (0.15)	0.01 (0.06)

Legend: a = treatment with the addition of distilled water, b = Treatment with the addition of BG11.

3.5. Nutrient recovery

The recovery of nutrients from the growing medium, especially when it comes to an agro-industrial wastewater that presents environmental risks, is essential to reduce the environmental impacts from bioremediation and the possibility of valuing the biomass produced with the generation of value-added products.

The recovery of nutrients such as nitrogen and phosphorus by microalgae is mainly related to the algae assimilation mechanism [44]. Ammonia compounds, for example, are mainly assimilated for microalgal growth, whereas inorganic orthophosphates are the form of phosphorus preferred by algae [45]. The values of final concentrations and removal efficiency of N-NH₄⁺ and P in the cultures are presented in Table 7.

In relation to COD, no control (BG11 without addition of vinasse) was not identified its presence since the beginning, which can be explained by the low concentration of carbon in the used culture medium. In cultures that generate cell growth, an increase in the concentration of COD was observed, which was already

expected due to the release of organic compounds by microalgae, such as extracellular polymeric substances (EPS) [46,47]. EPS are substances resulting from microbial growth, which are released due to cell lysis and absorption of organic matter and are composed of metabolites secreted in these processes [48,49]. Variations in environmental conditions may reflect on EPS production [50,51], such as changes from myxotrophic to heterotrophic growth [52], nutrient concentrations, light conditions and the presence of toxic substances [47].

As for P, all cultures had low initial concentration (Table 7), and during cultivation, presented a reduction in its concentration. The pH between 9 and 10.5 can cause P precipitation [53,54], which can justify the removal of P in the control (BG11 without the addition of vinasse), which had a high pH value and low growth cell rate. However, for cultures with 10% vinasse in BG11 and distilled water, in addition to precipitation, assimilation by microalgae may have occurred, as these cultures showed microalgae growth. Quintero-Dallos et al. [55] observed a removal efficiency of 25% of phosphorus from the cultivation of *C. vulgaris* in a medium with undiluted vinasse, a value close to that obtained in the present study.

Table 7 - Final concentrations and removal efficiency (E) of N-NH₄⁺, and P in cultures.

Culture	N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	E (%)	P (mg L ⁻¹)	E (%)
Control	0 (0)	100	0 (0.03)	100
10% _b	0 (0.25)	100	0 (0.02)	100
50% _b	5.89 (9.11)	-148.66	2.41 (1.02)	7.42
100%	11.93 (4.40)	-151.33	2.80 (1.51)	34.20
10% _a	0 (0.25)	100	0 (0.02)	0
50% _a	6.47 (1.14)	-172.61	0 (0.03)	100

Legend: a = treatment with the addition of distilled water, b = Treatment with the addition of BG11.

Nitrogen is supplied as a nutrient for algae mainly in the form of nitrate (NO_3^-), ammonia nitrogen (N-NH_4^+), and urea; however, its assimilation will depend on the pH of the culture medium [56]. Regarding N-NH_4^+ , the control (BG11 without the addition of vinasse), 10% vinasse in BG11 and 10% vinasse in distilled water, which already had a low concentration at the beginning of cultivation, showed a reduction of 100%, achieving zero concentration of ammonia at the end of cultivation.

When analyzing the NH_3 fraction present in N-NH_4^+ , it was possible to observe that the cultures with 100% vinasse and 50% vinasse both in BG11 and in distilled water, showed a NH_3 fraction below 1%, indicating that the temperature and the low pH values were not enough for nitrogen volatilization. Thus, this behavior indicates that the main removal route was by nitrification, since such culture did not present sufficient growth rate for biomass assimilation. Furthermore, such cultures showed an increase in the concentration of N-NH_4^+ , of 148.52%, 173% and 151.16%, respectively, which can be explained by the process of ammonification [57]. Regarding the cultures with 10% vinasse in BG11 and the control, they presented NH_3 fractions above 70% and 90% (from the third to the fifth day), respectively, indicating the volatilization of nitrogen in the form of NH_3 as the main route of removal. Finally, the cultivation with 10% vinasse in distilled water showed a fraction of NH_3 that varied between 13 and 44% throughout the cultivation. This result may indicate the removal of nitrogen by assimilation of N-NH_4^+ by the biomass and nitrification, in addition to the volatilization of the free fraction of ammoniacal nitrogen, but in lower percentages than in previous crops.

De Melo et al. [2] and Marques et al. [58] cultivated *Chlorella* sp. in vinasse with a dilution of 2% and 20%, respectively, and achieved a removal efficiency of 100% of TKN in the cultivation with 2% vinasse and 100% of nitrogen and phosphorus in the cultivation with 20% vinasse. Data obtained in the present study for cultivation with 10% vinasse suggest that low concentration vinasse is not an inhibiting factor for nutrient recovery by microalgae. In the study carried out by Candido and Lambardi [40] a 50% reduction in ammonia nitrogen and 60% in organic nitrogen was verified when *C. vulgaris* was cultivated in a medium with 80% digested vinasse. The reduction of nutrients in the culture medium indicates that microalgae can be cultivated for both biomass generation and effluent bioremediation [59].

The TKN balances of cultures in BG11 medium and distilled water medium are shown in Figures 5 and 6, respectively, in which the concentrations of organic nitrogen (Norg.) and ammonia nitrogen for the 1st and 14th day of each culture were identified. It is verified that ammonia nitrogen increased for 50% vinasse cultivation in BG11 due to Norg degradation in ammonia. The increase in TKN at the end of the cultivation compared to the beginning was due to the addition of sodium nitrate (NaNO_3) from the BG11 medium, which was assimilated by the biomass and converted into Norg. [57].

Cultivation with 100% vinasse also showed an increase in the TKN value from the increase in ammonia nitrogen, which can be explained by the high concentration of nitrate present in the raw vinasse [60] being assimilated by biomass and converted into Norg. On the other hand, cultures with 10% vinasse in both BG11 and distilled water showed an increase in the concentration of Norg., which may have occurred due to the assimilation of N-NH_4^+ by microalgae and converted into Norg, indicating biomass production and nutrient recovery.

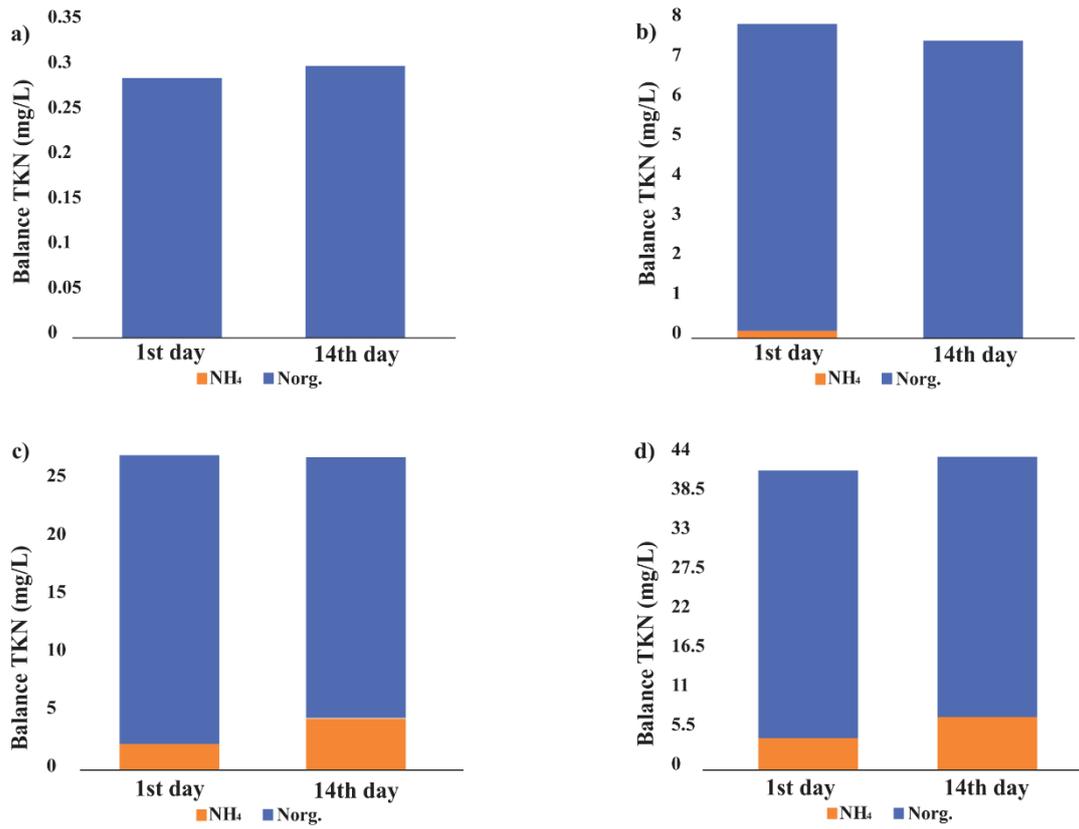


Figure 5 – TKN balance (concentration of Norg. and ammonia) for the 1st and 14th days of cultivation in BG11 medium: a) Control (BG11 without the addition of vinasse), b) 10% vinasse in BG11, c) 50% vinasse in BG11, d) 100%.

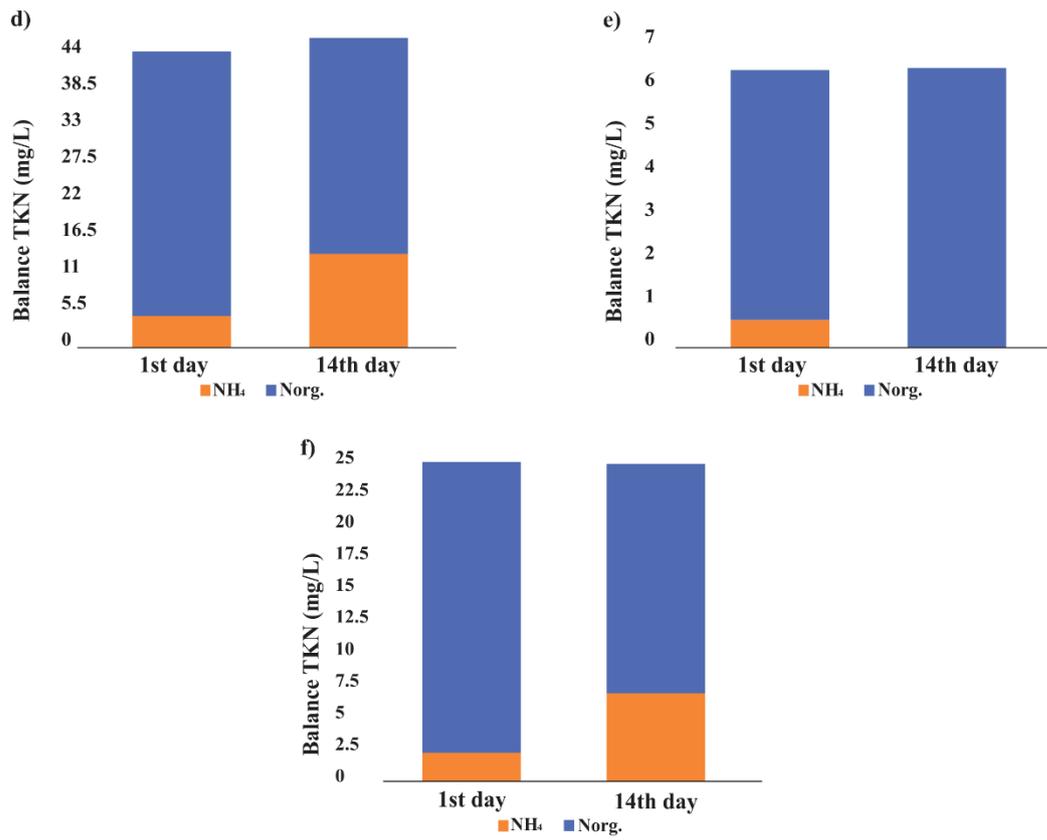


Figure 6 - Balance of TKN (concentration of Norg. and ammonia) for the 1st and 14th days of cultivation in distilled water medium: d) 100%, e) 10% vinasse in distilled water, f) 50% vinasse in distilled water.

4. CONCLUSIONS

Microalgae presented better development capacity when cultivated in medium with low concentrations of vinasse, i.e., 10% of vinasse addition. It was verified that the cultures with 10% vinasse both in BG11 and in distilled water presented chl *a* concentration and biomass productivity corresponding to the total biomass yields, which suggests that the low concentration of vinasse did not inhibit microalgal growth. These cultures showed 100% removal efficiency of P and N-NH₄⁺, which demonstrates the possibility of using microalgae for bioremediation of vinasse. However, specifically for nitrogen, it was found that the main removal mechanism was volatilization, with no considerable recovery of the nutrient in the form of biomass.

Considering that vinasse has different bacterial biomasses, studies related to the proliferation of heterotrophic microorganisms in vinasse can be suggested for future work. In addition, due to its physical and chemical characteristics with high polluting potential, it can be concluded that dilution and pH correction before starting microalgae cultivation is essential to increase algae productivity. For future studies, the pre-treatment of vinasse can be suggested to reproduce better the effect achieved via dilution on a large scale.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) [grant number 404980/2016-3 and 303909/2019-6].

REFERENCES

- [1] I. Johnson, M. Abubakar, S. Ali, M. Kumar, Cyanobacteria/microalgae for distillery wastewater treatment- past, present and the future, Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816809-7.00010-5>.
- [2] R.G. de Melo, A.F. de Andrade, R.P. Bezerra, D.S. Correia, V.C. de Souza, A.C. Brasileiro-Vidal, D. de A. Viana Marques, A.L.F. Porto, Chlorella vulgaris mixotrophic growth enhanced biomass productivity and reduced toxicity from agro-industrial by-products, Chemosphere. 204 (2018) 344–350. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.039>.
- [3] T. Goes, R. Marra, G.S. e Silva, Setor sucroalcooleiro no Brasil situação atual e perspectivas, Rev. Política Agrícola. 17 (2008) 39–51. <https://seer.sede.embrapa.br/index.php/RPA/article/view/407>.
- [4] E.B. Sydney, J.C. de Carvalho, L.A.J. Letti, A.I. Magalhães, S.G. Karp, W.J. Martinez-Burgos, E. de S. Candeo, C. Rodrigues, L.P. de S. Vandenberghe, C.J.D. Neto, L.A.Z. Torres, A.B.P. Medeiros, A.L. Woiciechowski, C.R. Soccol, Current developments and challenges of green technologies for the valorization of liquid, solid, and gaseous wastes from sugarcane ethanol production, J. Hazard. Mater. 404 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124059>.
- [5] R. de O. Bordonal, J.L.N. Carvalho, R. Lal, E.B. de Figueiredo, B.G. de Oliveira, N. La Scala, Sustainability of sugarcane production in Brazil. A review, Agron. Sustain. Dev. 38 (2018). <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0490-x>.
- [6] E.B. Sydney, C. Larroche, A.C. Novak, R. Nouaille, S.J. Sarma, S.K. Brar, L.A.J. Letti, V.T. Soccol, C.R. Soccol, Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source, Bioresour. Technol. 159 (2014) 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.042>.
- [7] A.K. de S. Silva, Carlos Eduardo de Farias; Abud, Anaerobic biodigestion of sugarcane vinasse under mesophilic conditions using manure as inoculum, Rev. Ambient. Água. 11 (2016) 763–777. <https://doi.org/10.4136/1980-993X>.
- [8] G. Araujo, S. Valle, VINHAÇA - CONCEITO , DESAFIOS E OPORTUNIDADES : UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, (2016).
- [9] C.E.R. Reis, B. Hu, Vinasse from sugarcane ethanol production: Better treatment or better utilization?, Front. Energy Res. 5 (2017). <https://doi.org/10.3389/fenrg.2017.00007>.
- [10] M. Parsaee, M. Kiani Deh Kiani, K. Karimi, A review of biogas production from sugarcane vinasse, Biomass and Bioenergy. 122 (2019) 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.034>.
- [11] P.S. Santos, M. Zaiat, C.A. Oller do Nascimento, L.T. Fuess, Does sugarcane vinasse composition variability affect the bioenergy yield in anaerobic systems? A dual kinetic-energetic assessment, J. Clean. Prod. 240 (2019) 118005. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118005>.
- [12] J. Hoarau, Y. Caro, I. Grondin, T. Petit, Sugarcane vinasse processing: Toward a status shift from waste to valuable resource. A review, J. Water Process Eng. 24 (2018) 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2018.05.003>.
- [13] N.K.. Singh, D.B. Patel, Microalgae for Bioremediation of Distillery Effluent, Arming Food Water Secur. Sustain. 83 Agric. Rev. 10 (2012) 83–109. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4500-1_4.
- [14] G.P. Ortegón, F.M. Arboleda, L. Candela, K. Tamoh, J. Valdes-Abellan, Vinasse

- application to sugar cane fields. Effect on the unsaturated zone and groundwater at Valle del Cauca (Colombia), *Sci. Total Environ.* 539 (2016) 410–419. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.153>.
- [15] V. Parnaudeau, N. Condom, R. Oliver, P. Cazeville, S. Recous, Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 1553–1562. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.012>.
- [16] A.K. Koyande, K.W. Chew, K. Rambabu, Y. Tao, D.T. Chu, P.L. Show, Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans, *Food Sci. Hum. Wellness.* 8 (2019) 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.03.001>.
- [17] S. Aslan, I.K. Kapdan, Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae, *Ecol. Eng.* 28 (2006) 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2006.04.003>.
- [18] J.L. Salgueiro, L. Pérez, R. Maceiras, A. Sánchez, A. Cancela, Bioremediation of wastewater using *Chlorella vulgaris* microalgae: Phosphorus and organic matter, *Int. J. Environ. Res.* 10 (2016) 465–470. <https://doi.org/10.22059/ijer.2016.58766>.
- [19] A.P. Batista, L. Ambrosano, S. Graça, C. Sousa, P.A.S.S. Marques, B. Ribeiro, E.P. Botrel, P. Castro Neto, L. Gouveia, Combining urban wastewater treatment with biohydrogen production - An integrated microalgae-based approach, *Bioresour. Technol.* 184 (2015) 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.064>.
- [20] S.M. Cardoso, O.R. Pereira, A.M.L. Seca, D.C.G.A. Pinto, A.M.S. Silva, Seaweeds as preventive agents for cardiovascular diseases: From nutrients to functional foods, *Mar. Drugs.* 13 (2015) 6838–6865. <https://doi.org/10.3390/md13116838>.
- [21] S. Zorn, B. Gonçalves, L. Canilha, D. Guimarães, M. Silva, Extração de Óleo Microalgal por Solventes Orgânicos: Uma Alternativa para a Produção de Biodiesel., *Janus.* 13 (2016).
- [22] E.B. Sydney, C.J.D. Neto, J.C. de Carvalho, L.P. de S. Vandenberghe, A.C.N. Sydney, L.A.J. Letti, S.G. Karp, V.T. Soccol, A.L. Woiciechowski, A.B.P. Medeiros, C.R. Soccol, Microalgal biorefineries: Integrated use of liquid and gaseous effluents from bioethanol industry for efficient biomass production, *Bioresour. Technol.* 292 (2019) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121955>.
- [23] H. Santana, C.R. Cereijo, V.C. Teles, R.C. Nascimento, M.S. Fernandes, P. Brunale, R.C. Campanha, I.P. Soares, F.C.P. Silva, P.S. Sabaini, F.G. Siqueira, B.S.A.F. Brasil, Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization, *Bioresour. Technol.* 228 (2017) 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.075>.
- [24] V. Veloso, A. Reis, L. Gouveia, H.L. Fernandes, J.A. Empis, J.M. Novais, Lipid production by *Phaeodactylum tricornutum*, *Bioresour. Technol.* 38 (1991) 115–119. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90141-6](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90141-6).
- [25] R.A. ANDERSEN, *Algal Culturing Techniques*, 1st Editio, Academic Press, 2005.
- [26] T. Cavalier-Smith, Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa, *Eur. J. Protistol.* 50 (2014) 472–495. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2014.07.002>.
- [27] M. BICUDO, CE de M.; MENEZES, Gêneros de algas de águas continentais do

- Brasil (chave para identificação e descrições)., 3^a edição, São Carlos, 2006.
- [28] C. Bocaina, Nossa cachaça, (n.d.). <https://www.cachacabocaina.com.br/bocaina/> (accessed August 2, 2021).
- [29] K. Issarapayup, S. Powtongsook, P. Pavasant, Flat panel airlift photobioreactors for cultivation of vegetative cells of microalga *Haematococcus pluvialis*, *J. Biotechnol.* 142 (2009) 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.04.014>.
- [30] R.V. Emerson, K; Russo, R.C; Lund, R.E; Thurston, Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature., *J. Fish. Board Canada.* 32 (1975) 2379–2383. <https://doi.org/https://doi.org/10.1139/f75-274>.
- [31] APHA-AWWA-WEF, ed., Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, in: 22nd ed., American Public Health Association (APHA), Washington, DC., 2012.
- [32] C. KJELDAHL, A new method for the determination of nitrogen in organic matter., *Z Anal Chem.* 22 (1883) 366.
- [33] A.I. VOGEL, *Análise Química Quantitativa.*, 5 ed., Rio de Janeiro, 1992.
- [34] A.T. de Matos, *Manual de Análise de Resíduos Sólidos e Águas Residuárias*, 2015.
- [35] E.A. Nush, Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination., *Arch. Hydrobiol. Beih.* 14 (1980) 14-36.
- [36] N.N. (NEN), Water: Spectrophotometric Determination of Chlorophyll a Content., in: *Ned. Norm, Deft, The Netherlands*, 1981.
- [37] R CORE TEAM, *A Language and Environment for Statistical Computing*, (2020). <https://cran.r-project.org>.
- [38] D.C.. Carslaw, K. Ropkins., *Openair --- an R package for air quality data analysis*, *Environ. Model. Softw.* 27–28 (2012) 52–61.
- [39] S.S.M. MOSTAFA, E.A. SHALABY, G.I. MAHMOUD, Cultivating Microalgae in Domestic Wastewater for Biodiesel Production, *Not. Sci. Biol.* 4 (2012) 56–65. <https://doi.org/10.15835/nsb417298>.
- [40] C. Candido, A.T. Lombardi, The physiology of *Chlorella vulgaris* grown in conventional and biodigested treated vinasses, *Algal Res.* 30 (2018) 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.01.005>.
- [41] C.A. Christofolletti, J.P. Escher, J.E. Correia, J.F.U. Marinho, C.S. Fontanetti, Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use, *Waste Manag.* 33 (2013) 2752–2761. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.09.005>.
- [42] R. Rezende, O. De Queiroz, F. Araújo, J. Luiz, D. Medeiros, R. Moreira, Bioresource Technology Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse, *Bioresour. Technol.* 204 (2016) 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.077>.
- [43] C.D. Calixto, J.K. da Silva Santana, E.B. de Lira, P.G.P. Sassi, R. Rosenhaim, C.F. da Costa Sassi, M.M. da Conceição, R. Sassi, Biochemical compositions and fatty acid profiles in four species of microalgae cultivated on household sewage and agro-industrial residues, *Bioresour. Technol.* 221 (2016) 438–446. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.066>.
- [44] T. Cai, S.Y. Park, Y. Li, Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 19 (2013) 360–369. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.030>.
- [45] A.L. Gonçalves, J.C.M. Pires, M. Simões, A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment, *Algal Res.* 24 (2017) 403–415. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.008>.

- [46] M.D. Tango, M.L. Calijuri, P.P. Assemany, E. De Aguiar Do Couto, Microalgae cultivation in agro-industrial effluents for biodiesel application: Effects of the availability of nutrients, *Water Sci. Technol.* 78 (2018) 57–68. <https://doi.org/10.2166/wst.2018.180>.
- [47] M. Wang, W.C. Kuo-Dahab, S. Dolan, C. Park, Kinetics of nutrient removal and expression of extracellular polymeric substances of the microalgae, *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp., in wastewater treatment, *Bioresour. Technol.* 154 (2014) 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.047>.
- [48] F. Jorand, F. Zartarian, F. Thomas, J.C. Block, J.Y. Bottero, G. Villemin, V. Urbain, J. Manem, Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs, *Water Res.* 29 (1995) 1639–1647. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)00350-G](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)00350-G).
- [49] C. Park, J.T. Novak, R.F. Helm, Y.O. Ahn, A. Esen, Evaluation of the extracellular proteins in full-scale activated sludges, *Water Res.* 42 (2008) 3879–3889. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.05.014>.
- [50] C. Wang, M., Teague, P., Park, Effects of activated sludge reactor and EPS on anaerobic digestion and sludge pretreatment. Conference proceeding, in: *Water Environ. Fed. 24th Annu. Residuals Biosolids Manag. Conf.*, 2010.
- [51] S. fang Yang, X. yan Li, Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on the characteristics of activated sludge under non-steady-state conditions, *Process Biochem.* 44 (2009) 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.09.010>.
- [52] O. V. Shipin, P.G.J. Meiring, R. Phaswana, H. Kluever, Integrating ponds and activated sludge process in the PETRO concept, *Water Res.* 33 (1999) 1767–1774. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00389-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00389-3).
- [53] Z. Arbib, J. Ruiz, P. Álvarez-Díaz, C. Garrido-Pérez, J.A. Perales, Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: Wastewater tertiary treatment, CO₂ bio-fixation and low cost biofuels production, *Water Res.* 49 (2014) 465–474. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.036>.
- [54] R. Whitton, F. Ometto, M. Pidou, P. Jarvis, R. Villa, B. Jefferson, Microalgae for municipal wastewater nutrient remediation: mechanisms, reactors and outlook for tertiary treatment, *Environ. Technol. Rev.* 4 (2015) 133–148. <https://doi.org/10.1080/21622515.2015.1105308>.
- [55] V. Quintero-Dallos, J.B. García-Martínez, J.E. Contreras-Roperro, A.F. Barajas-Solano, C. Barajas-Ferrerira, R. Lavecchia, A. Zuurro, Vinasse as a sustainable medium for the production of *Chlorella vulgaris* UTEX 1803, *Water (Switzerland)*. 11 (2019) 1–14. <https://doi.org/10.3390/w11081526>.
- [56] J.U. GROBBELAAR, Inorganic Algal Nutrition, in: P.E. Amos Richmond, Ph.D., P.D. Qiang Hu (Eds.), *Handb. Microalgal Cult. Appl. Phycol. Biotechnol.* Second Ed., Second Ed., Boca Raton, FL., 2013: pp. 359–368. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch18>.
- [57] F. BASTOS, M. VON SPERLING, Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção, in: *Proj. PROSAB*, 5^a edição, J. Sholna, Rio de Janeiro, 2009: p. 428.
- [58] S.S.I. Marques, I.A. Nascimento, P.F. De Almeida, F.A. Chinalia, Growth of *Chlorella vulgaris* on sugarcane vinasse: The effect of anaerobic digestion pretreatment, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171 (2013) 1933–1943. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0481-y>.
- [59] M.A.S. Da Silva, N.P. Griebeler, L.C. Borges, Use of stillage and its impact on soil properties and groundwater, *Rev. Bras. Eng. Agric. e Ambient.* 11 (2007)

- 108–114. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662007000100014>.
- [60] F.K. Godoy, Lixiviação dos íons nitrato e potássio em latossolo submetido à aplicação de diferentes doses e tipos vinhaça, (2013).